

Zytophotometrische Untersuchungen über das
Chromatin – und DNS – Verteilungsmuster
an Lymphknotenzellen gesunder und an
lymphatischer Leukose erkrankter Schafe

Wolfgang Schmahl

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Veterinär - Pathologischen Institut
der Justus Liebig - Universität zu Gießen
Direktor : Professor Dr. E. Weiß

Zytophotometrische Untersuchungen über das
Chromatin - und DNS - Verteilungsmuster
an Lymphknotenzellen gesunder und
an lymphatischer Leukose erkrankter Schafe

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig - Universität zu Gießen

Eingereicht von

W O L F G A N G S C H M A H L

Tierarzt aus Memmingen

Gießen 1971

Diese Arbeit ist im Sonderforschungsbereich 47 (Virologie ,
Gießen) entstanden und wurde auf seine Veranlassung unter
Verwendung der ihm von der Deutschen Forschungsgemeinschaft
zur Verfügung gestellten Mittel durchgeführt.

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen

Fakultät in Gießen

Dekan : Professor Dr. G. Lämmler

Berichterstatter : Professor Dr. E. Weiß

Tag der mündlichen Prüfung : 9. Juli 1971



Meiner lieben Mutter



INHALT

A.	EINLEITUNG	1
B.	LITERATURÜBERSICHT	2
I.	DIE KERNSTRUKTUREN	2
	1.1 Begriffsbestimmungen	2
	1.2 Das Chromozentrum	4
	1.3 Das Sexchromatin	5
	1.4 Der Nukleolus	9
II.	DIE MORPHOLOGISCHE TYPISIERUNG DER ZELLEN NACH IHRER KERNSTRUKTUR	12
III.	ZUORDNUNG VON EU-UND HETEROCHROMATIN (ISO-UND HETEROPYKNOSE) ZU DEN CHROMOSOMEN	14
IV.	DIE BEDEUTUNG DER HETEROPYKNOSE	16
V.	AUFBAU UND STRUKTUR DER CHROMOSOMEN	19
	5.1 Die Nukleinsäuren	19
	5.2 Die Histone	24
VI.	DER DNS-GEHALT SOMATISCHER GEWEBE	26
	6.1 Allgemeine Gesetzmäßigkeit der DNS-Konstanz	26
	6.2 Variation im Generationszyklus	27
	6.3 Variation infolge unterschiedlicher meta- bolischer Aktivität	31
VII.	DIE GESETZMÄSSIGE ANORDNUNG DES CHROMATINS IM INTERPHASEKERN	36
VIII.	DIE MITOSEAKTIVITÄT VON TUMOREN	43
IX.	PHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG VON TUMORZELL- KERNEN -BESTIMMUNG DES GESAMT-DNS-GEHALTES-	45
X.	DER KARYOTYPUS VON TUMORZELLEN	47

XI.	BESTEHT BEI TUMOREN EIN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CHROMOSOMENZAHL UND DNS-GEHALT ?	49
XII.	DER BEGRIFF "TUMOR-STAMMLINIE" UND SEINE DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG	50
XIII.	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON TUMOR- ZELLEN	54
XIV.	DIE MIKROSPEKTROPHOTOMETRIE	56
	14.1 Physikalische Grundlagen	56
	14.2 Problematik der Anwendung der Spektropho- tometrie auf das histologische Präparat	59
	a) Objektinhomogenität und Schnittdicken- unterschiede	59
	b) Reflexion, Brechung, Streuung und Beugung des Lichtes	61
	c) " Out of focus-Effekt "	63
	d) Die Vorbehandlung des Materials	64
	14.3 Die Gültigkeit des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes am histologischen Objekt	65
	14.4 Eichverfahren	66
	14.5 Absorptionsspektren der biologischen Objekte	66
XV.	DIE FEULGEN'sche KERNFÄRBUNG	69
	15.1 Die Fixierung des Gewebes	70
	15.2 Die Hydrolyse	71
	15.3 Die Farbreaktion	76
	15.4 Spezifität der Farbreaktion und deren Ausnahmen	79
	15.5 Stöchiometrie der FEULGEN-Färbung	79
	15.6 Weitere Behandlung	81

C	MATERIAL und METHODIK	83
I.	MATERIAL	84
II.	METHODIK	85
	2.1 Präparation	85
	2.2 Messung	86
D	ERGEBNISSE	89
I.	PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE SOWIE HISTOLOGISCHE BEFUNDE	89
II.	MIKROSPEKTROPHOTOMETRISCHE ERGEBNISSE	90
	2.1 Gesamt-DNS-Gehalt	98
	2.2 Einzelpunkt-Mikrospektrophotometrie	101
	2.3 Spektrale Absorptionsverteilungskurven	115
E	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	114
F	ZUSAMMENFASSUNG	125

A E I N L E I T U N G

Die Ergebnisse aus den Gebieten der Genetik, Biochemie und Histochemie haben in den letzten Jahren zu einer neuen Auffassung über die Bedeutung der Kernstrukturen geführt. Insbesondere erfuhren die Begriffe Eu- und Heterochromatin eine umfassende Wandlung.

Die Zytophotometrie erlaubt eine objektive, mathematisch exakte Erfassung des Chromatins, speziell der DNS. Man ist bestrebt, durch die Abgrenzung der Anteile von Euchromatin zu Heterochromatin, eine Aussage über deren funktionelle Bedeutung zu gewinnen. Insbesondere auf dem Gebiet der Onkologie wird versucht zu ergründen, ob sich in der Tumorzelle die Anteile Eu- zu Heterochromatin verschieben.

Bisherige Ergebnisse, die von Untersuchungen an Tumoren des Menschen und der Labortiere stammen, weisen auf eine vermehrte Heterochromatisierung der Tumorzellen hin.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, ob sich das Chromatinverteilungsmuster in Zellen aus leukotisch veränderten Schaflymphknoten von dem in Zellen normaler Schaflymphknoten unterscheidet und ob damit eine Differenzierung der " Leukosezellen " möglich ist.

B L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

I. DIE KERNSTRUKTUREN

(1.1) Begriffsbestimmungen

Betrachtet man den Kern einer unbeeinflusst lebenden tierischen oder menschlichen Zelle, so ergibt sich ein völlig strukturloses Bild, wie seit den Beobachtungen von LEWIS und LEWIS (1924) an Zellkulturen und von CHAMBERS (1924) an Mikrodissenktionen bekannt ist. Selbst das Phasenkontrastverfahren vermag nur eine homogene, milchglasartige Trübung darzustellen.

Vergleicht man hingegen damit das Bild einer fixierten und angefärbten Zelle, so erkennt man mit ziemlicher Regelmäßigkeit auftretende körnige und schollige Verdichtungen. Diese sind meist rundlich bis oval, relativ scharf begrenzt und von einer durchschnittlichen Größe von 0,25-0,5 μ (Messungen von FRENSTER, 1965; Hinweis bei HARBERS, LEDERER, SANDRITTER und SPAAR, 1968a). Daneben sieht man auch langgestreckte Gebilde, die gelegentlich von einer oder mehreren vakuolären Aufhellungen durchsetzt sind; dadurch entsteht schließlich das Bild einer netzartigen Struktur, deren Begrenzung gegenüber dem übrigen Karyoplasma an Schärfe eingebüßt hat. Der übrige Kerninnenraum ist relativ locker und besitzt ein unregelmäßig körniges Aussehen.

Der Schlüssel zum Verständnis des Unterschieds zwischen dem Kernbild in vivo und dem nach Fixation besteht in der Erklärung eines Wechsels aus dem hydratisierten Zustand in einen m.o.w. dehydratisierten und somit kondensierten Zustand. Hierbei handelt es sich um einen Kontrastierungsvorgang, der durch die Einwirkung des Fixationsmittels auf die sich normalerweise in einem flüssigen Aggregatzustand befindende Zelle hervorgerufen wird. Diesen Entmischungsprozess bezeichnet man gewöhnlich als Koazervation (NETTER, 1959).

Man bezeichnet die Kernsubstanz ganz allgemein als Chromatin, die scholligen Strukturen des Fixationsbildes als Heterochromatin im Gegensatz zu dem locker verbleibenden Euchromatin.

HEITZ, der 1928 diese Begriffe prägte, schreibt :

" Heterochromatin ist ein Teil der Kernstruktur, welche die telophasische Umbildung nicht durchmacht, sondern als solche im Kern sichtbar erhalten bleibt und auch in der

sichtbar erhalten bleibt und auch in der Prophase vom Euchromatin durch die intensive Färbung zu unterscheiden ist" .

LINNERT (1955) sieht im Heterochromatin eine Struktur, die sich vom Euchromatin nur durch ihre engere Spiralisierung, nicht jedoch durch ihre chemische Zusammensetzung unterscheidet. Dieser heute allgemein anerkannten Auffassung stand noch in den Jahren 1940-1950 die Meinung von DARLINGTON und LA COUR, BROWN, LIMA DE FARIA und GOTTSCHALK gegenüber, welche das Heterochromatin als besonders große, mit Nukleinsäuren überladene Massen deuteten, welche durch enge Berührung verschmelzen können. Diese Hypothese ging also vom Substanzcharakter aus, im Gegensatz zur heutigen Anschauung, die im Heterochromatin nur einen vom Euchromatin abweichenden Zustand erkennt.

Während die Bezeichnungen Eu- und Heterochromatin zunächst vom rein morphologischen Bild her entstanden, erweiterte sie HEITZ (1933) selbst dadurch, daß er Euchromatin als genetisch aktives und Heterochromatin als genetisch passives Chromatin bezeichnete. Genauere Untersuchungen in neuerer Zeit beschäftigten sich intensiv mit diesem Problem, ebenso wie mit der Frage nach dem Verhalten der heterochromatischen Strukturen im Mitosezyklus der Zelle. Beide Probleme werden mit Hilfe der Autoradiographie studiert.

Auf diese Weise konnte der früher rein morphologisch verstandene Begriff Heterochromatin untergliedert werden und wird heute ausschließlich als funktioneller Begriff gebraucht. Will man hingegen rein morphologisch das Vorhandensein scholliger Kernstrukturen beschreiben, so verwendet man den schon in den Anfangszeiten der Zytogenetik geprägten Begriff der " Heteropyknose " (DARLINGTON, 1937). Das locker angeordnete Chromatin nennt man demgegenüber "isopyknotisch".

Mit Hilfe der Autoradiographie konnte gezeigt werden, daß es zwei Arten von Chromatin gibt: eines, das sich im Zellzyklus relativ früh verdoppelt (=repliziert) und eines, das sich spät verdoppelt (LIMA DE FARIA und JAWORSKA, 1968) (Näheres siehe unter "Der Zellzyklus").

Ursprünglich erschien es so, als würde dieses Kriterium gleichzeitig auch die Begriffe Eu- und Heterochromatin unterscheiden

helfen. Man identifizierte nämlich die spätreplizierenden Kernstrukturen mit dem Heterochromatin und dementsprechend die frühreplizierenden mit dem Euchromatin. Es stellte sich jedoch bald heraus, daß auch Teile des locker gefügten Chromatin spät replizieren, also dem Begriff Heterochromatin zugeordnet werden, trotzdem sie isopyknotisch sind. Ebenso gibt es heteropyknotisches Chromatin, das frührepliziert und somit die Bezeichnung heteropyknotisches Euchromatin trägt (Übersicht bei SANDRITTER 1970).

Ein weiteres Kriterium für die Abgrenzung der funktionellen Begriffe Eu : Heterochromatin stellt deren genetische Aktivität dar, gemessen an der Menge RNS - einer bestimmten Nukleinsäure -, welche in den betreffenden Chromatinabschnitten synthetisiert wird. In der Autoradiographie wird diese Nukleinsäure durch ^3H -markiertes Uridin zur Darstellung gebracht, wobei die dichten Kernregionen nicht, oder viel schwächer markiert sind, als das Euchromatin. Auch in Zellen ohne sichtbare Heterochromatinblöcke finden sich Aussparungen im Markierungsbild, die diesen vermutlich entsprechen. Heterochromatische Abschnitte sind demnach genetisch inaktiv oder weniger aktiv, wobei es keine Rolle zu spielen scheint, ob sie in der Interphase zu mikroskopisch sichtbaren Chromozentren kondensiert sind oder nicht (SIEGER, PERA, SCHWARZACHER, 1970 a+b).

ZUSAMMENFASSEND ist zu sagen, daß das Heterochromatin einen rein funktionellen Begriff darstellt. Es ist gekennzeichnet durch späte Replikation im Zellzyklus sowie durch genetische Inaktivität. Das Euchromatin hingegen zeichnet sich durch frühe Replikation, sowie genetische Aktivität aus, jedoch nicht - genau wie das Heterochromatin - durch das Vorhandensein eines bestimmten Kondensationszustandes.

(1.2) Das Chromozentrum

Ein weiterer Begriff, der zunehmend in der Literatur Eingang fand, ist der des " Chromozentrums ". Dies stellt nichts anderes dar, als eng beieinander liegende und zum Teil miteinander verschmolzene heteropyknotische Blöcke. Die Verschmelzung geschieht, wie in einigen Fällen nachweisbar ist, bereits in der

Meiose durch Ausbildung eines sog. " synaptischen Komplexes ". Innerhalb des meiotischen Zyklus kommt es wieder zu einer Trennung der heteropyknotischen Teile, jedoch je nach Tierart in unterschiedlichen Stadien.

Zu einer Verschmelzung heteropyknotischer Blöcke kann es auch im Laufe der Evolution von Rassen, Arten und höheren biologischen Einheiten kommen, wenn nämlich bestimmte Chromosomen miteinander verschmelzen. Sofern bei diesem, auch als " zentrische Fusion " bezeichnetem Vorgang die betroffenen Chromosomen Träger heteropyknotischer Blöcke sind (siehe Kapitel III), erscheint im Interphasekern eine dichtere Chromatinanhäufung. Das nach seinem Erstbeschreiber auch als " ROBERTSON-Prozess " benannte evolutionäre Ereignis (MATTHEY, 1964; HSU und ARRIGHI, 1966), ist im Gegensatz zur oben erwähnten, zyklusbedingten Form irreversibel.

(1.3) Das Sexchromatin

Es handelt sich hierbei um ein im Durchschnitt $0,8 - 1,4 \mu$ großes Chromozentrum, das in den Zellkernen weiblicher Individuen in randständiger Position meist gut zu erkennen ist und nach seinem Erstbeschreiber BARR (1949) auch BARR-body genannt wird.

Die Häufigkeit des Auftretens des Sexchromatin ist in erster Linie abhängig vom Geschlecht, weiterhin von der Art des untersuchten Organs, sowie auch von der Vorbereitung des Gewebes zur histologischen Untersuchung. Besonders häufig läßt es sich im ZNS der verschiedenen Tierarten ausmachen; es kann in bis zu 90% aller Ganglienzellen weiblicher Tiere gefunden werden. In den anderen Geweben weiblicher Individuen schwankt die Häufigkeit zwischen 40 und 95% (BARR, 1966).

STRUCK (1961) untersuchte die Häufigkeit des Vorkommens in den Zellen der Backenschleimhaut verschiedener weiblicher Tiere und fand bei Hunden in 45%, bei Katzen in 29%, bei Pferd, Schwein und Rind nur in ca. 2% aller Zellen ein eindeutiges Sexchromatin. Besonders eingehende Studien an menschlichen Zellkulturen zeigten eine Häufigkeit von 64 - 78% (KLINGER, SCHWARZACHER und WEISS, 1967). In synchronisierten menschlichen

Fibroblastenkulturen konnte SCHNEDL (1969 a) den Nachweis erbringen, daß die Häufigkeit des Sexchromatins im Ablaufe eines Teilungszyklus, d.h. zwischen dem Ende einer Mitose und dem Einsetzen der nächsten Teilung, zunimmt.

Wegen des speziellen färberischen Verhaltens des Sexchromatins und vor allem wegen seines ausschließlichen Vorkommens bei weiblichen Individuen wurde seit seiner Erstbeschreibung durch BARR und BERTRAM (1949) die Identität mit einem oder beiden der beim weiblichen Geschlecht vorhandenen X-Chromosomen postuliert. Erst die Untersuchungen von OHNO, KAPLAN und KINOSITA (1959) wiesen auf die Herkunft des Sexchromatin von nur einem X-Chromosom hin, das völlig heteropyknotisch ist. Der endgültige Beweis konnte in den folgenden Jahren durch Beobachtungen an Trisomien des X-Chromosoms (GRUMBACH, MORISHIMA und TAYLOR, 1963) erbracht werden, weiterhin an Zellen von Bos taurus, bei denen das X-Chromosom das einzige submetazentrische Chromosom ist und so in autoradiographischen Bildern leicht identifiziert werden kann (MUKHERJEE und SINHA, 1963). Dabei erwies sich nur ein X-Chromosom als spät replizierend und entspricht in dieser Hinsicht dem Sexchromatin des Interphasekerns. Insbesondere die simultane Photographie und Autoradiographie stellt hier ein elegantes Beweismittel dar (SCHNEDL, 1969 a). Nach den Vorstellungen von OHNO, KAPLAN und KINOSITA (1959) wird zufallsmäßig eines der beiden menschlichen X-Chromosomen bereits in einem frühen Fetalstadium in den heteropyknotischen Zustand übergeführt. Dies trifft prinzipiell auch für die meisten Tierarten zu, jedoch mit dem Unterschied, daß hier an der Bildung des X-Chromosoms auch noch heteropyknotische Blöcke beteiligt sind. Diese sollen nach Ansicht von MATTHEW (1961) ursprünglich von anderen Chromosomen (Autosomen) auf das X-Chromosom transloziert sein, nach Ansicht von OHNO (1964) durch Vervielfachung (Endoreduplikation) bereits vorhandener heteropyknotischer Abschnitte entstanden sein (Hinweis bei SCHMID, 1967). Bei den Tierarten mit dem sog. zusammengesetzten Typ des X-Chromosoms sind deren heteropyknotische Abschnitte unterschiedlich groß, je nachdem, ob an ihrer Bildung autosomales Material beteiligt ist oder nicht.

Bereits autoradiographische Untersuchungen von HSU (1962), die mittels ^3H -Uridinmarkierung die Frage nach der genetischen Aktivität des Sexchromatin klären sollten, erbrachten einen ersten Hinweis auf eine verminderte RNS-Syntheseleistung. Die zur selben Zeit von LYON (1961) durchgeführten genetischen Studien über die Vererbbarkeit von Haarfarbe und Fellzeichnung - Erbfaktoren, die an das X-Chromosom gebunden sind - eines bestimmten Mäusestammes zeigten phänotypisch eine Aufspaltung in zwei Gruppen, obwohl dies genotypisch bei gleicher Aktivität beider X-Chromosomen nicht zu erwarten wäre. LYON schloß daher in ihrer Hypothese auf die genetische Inaktivität eines X-Chromosoms, das, wie weitere Kreuzungsversuche zeigten (LYON, 1962), mit dem heteropyknotischen Sexchromatin identisch ist. Die Bedeutung dieses Vorgangs besteht darin, daß das beim weiblichen Individuum auf den X-Chromosomen lokalisierte genetische Potential nunmehr nicht in doppelter Form zur Gestaltung des Phänotyps beiträgt, sondern wie beim männlichen Geschlecht nur in einfacher Form.

Die Heteropyknose eines X-Chromosoms tritt bereits im Blastozystenstadium der Säugerembryonen auf, wobei zufällig das väterliche oder das mütterliche Homologen betroffen ist (MUKHERJEE und SINHA, 1964). Das einmal heteropyknotisch gewordene X-Chromosom verweilt zeitlebens in diesem Zustand (GRUMBACH und MORISHIMA, 1962). In Individuen mit mehr als zwei X-Chromosomen wird jedes zusätzliche X-Chromosom ebenfalls inaktiviert, so daß beispielsweise Zellen mit XXXY-Konstellation drei Sexchromatinkörperchen in den Interphasezellen erkennen lassen (GRUMBACH, MORISHIMA, TAYLOR, 1963).

Man hält es außerdem für möglich, daß sich die Heteropyknose nicht über das ganze X-Chromosom erstreckt, sondern daß an einem Ende ein kleiner Abschnitt im isopyknotischen Zustand verbleibt (SCHWARZACHER, 1970 a; MANN und MUKHERJEE 1970).

Wie bereits zu Eingang dieses Kapitels erwähnt, kann nicht in allen Zellkernen weiblicher Individuen ein Sexchromatin gefunden werden, obwohl dies auf Grund der Lyonhypothese erwartet werden müßte. Dieser scheinbare Widerspruch konnte jedoch durch

genetische und zytogenetische Studien aufgeklärt werden. Trotzdem der Prozentsatz sexchromatinnegativer Zellkerne in verschiedenen menschlichen Geweben 5 - 60% betragen kann, (KLINGER und SCHWARZACHER, 1960) konnte dennoch stets hinsichtlich X-gebundener Gene bei heterozygoten Frauen nur zwei Zellpopulationen nachgewiesen werden, wobei in der einen das von der Mutter stammende Gen, in der anderen das väterliche Gen aktiv war (ROSENBLOOM, KELLEY, HENDERSON, 1967).

Autoradiographische Studien (SCHNEDL, 1969 a + b) zeigten an sexchromatinnegativen Zellkernen weiblicher Tiere ebenso große und entsprechend lokalisierte Aussparungen der Markierung, wie sie sonst im Gebiet des Sexchromatins beobachtet werden. Auch eine genaue zeitliche Analyse dieser Markierungsversuche zeigten in beiden Zellkerntypen gleiche Ergebnisse (COOKING, 1967 a).

Demzufolge kann geschlossen werden, daß den Zellkernen ohne Sexchromatin nur das Kriterium der Heteropyknose (des X-Chromosoms) fehlt, während genetische Inaktivität und späte Replikation im Zellzyklus (siehe später) vorhanden sind. Auf Grund der beiden letzten Eigenschaften spricht man besser von der heterochromatischen Natur eines der beiden X-Chromosomen, die anscheinend willkürlich mit Heteropyknose gekoppelt sein kann.

Eine große Bedeutung erlangt im Zusammenhang mit der eigenen Arbeit die Frage nach der Konstanz der Position des Sexchromatins in Beziehung zu anderen definitiven Strukturen des Interphasekerns, da eine hier erkannte Gesetzmässigkeit als Modellfall für das generelle Verhalten des Heterochromatins dienen kann. Es gilt als allgemein akzeptiert, daß das Sexchromatin prinzipiell eine innige Lagebeziehung zur inneren Kernmembran besitzt. Selbst diejenigen Sexchromatinkörperchen, die hiervon abweichen und eine willkürliche Lage einnehmen, sind in Wirklichkeit zum größten Teil tatsächlich randständig, wie LEVIJ und MEULENDIJK (1960) auf Grund mathematisch-statistischer Überlegungen betonen. Der Irrtum ist auf das begrenzte Auflösungsvermögen des optischen Instruments zurückzuführen. Das andere Extrem kann in den abgeflachten Kernen von Ausstrichen

beobachtet werden: hier treten doppelt so viele randständige Sexchromatinkörperchen auf, als statistisch zu erwarten wäre; eine Erklärung dieser Tatsache ist bis heute noch nicht möglich.

Eine Ausnahme kann man den Nervenzellen von Katze und Opossum feststellen. Während bei letzteren Spezies 70% aller Sexchromatinkörperchen ohne Lagebeziehung zu irgend einer anderen Kernstruktur erscheinen (BARR, 1966), kann man bei der Katze eine besonders enge Assoziation an das Kernkörperchen erkennen, auf das im Folgenden noch kurz eingegangen werden soll. An der Katze wurden auch bisher die einzigen Untersuchungen über positionsändernde Faktoren durchgeführt: je älter das Tier, umso häufiger findet man das Sexchromatin der Ganglienzellen in Nukleolusnähe bzw. umso häufiger in den übrigen Geweben peripher an der Kernmembran. Ein weiterer Faktor ist die Zellalteration, wie sie durch experimentelle Reizung oder auch krankheitsbedingt erfolgen kann: während der Chromatolyse der Hypoglossuskern der Katze ist eine periphere Wanderung des Sexchromatins zu beobachten. Auch für dieses Phänomen fehlt bis heute eine Erklärungsmöglichkeit.

(1.4) Der Nukleolus

Der Nukleolus, auch als " Kernkörperchen " benannt, ist in vivo die einzige klar sichtbare Innenstruktur des Kernes, die in zahlreichen Formvarianten vorliegen kann. Es handelt sich dabei um einen oder mehrere, meist annähernd kugelige, ca. 2 - 3 μ große Gebilde in der Mitte oder auch am Rande des Kernes. Oft läßt sich im Fixationsbild (z.B. in Lymphozyten) ein schwächer anfärbbarer Innenteil von dem intensiv gefärbten Außenteil unterscheiden. Aus der Tatsache, daß undifferenzierte Embryonalzellen meist keinen, Fibroblasten, Endothelien und Gliazellen einen sehr kleinen, oft unscheinbaren Nukleolus besitzen, schließlich in Ganglienzellen meist ein besonders großer Nukleolus beobachtet wird, kann man für die Nukleolenform und -größe in gewissen Grenzen eine Abhängigkeit von der gewebsspezifischen Differenzierung der Zelle ableiten (GRUNDMANN, 1964). GRUNDMANN (1964) schreibt weiterhin: "eine solche Gesetzmäßigkeit gilt - in ähnlichen Grenzen - auch für

die Nukleolenzahl: während die meisten Ganglienzellen nur einen besonders großen Nukleolus besitzen, findet man in vielen Leberzellen, aber auch in einer bestimmten Lymphozytenform, zwei oder auch mehr Nukleolen. Polyploide Kerne enthalten mehr Nukleolen als diploide". Die unterschiedliche Anzahl findet, zumindestens teilweise, ihre Erklärung im Verschmelzen von Nukleolen. Dies kann an lebenden Zellen leicht beobachtet werden, ebenso wie auch die " Teilung " eines großen Nukleolus in kleinere (GHOSH und LETTRE, 1970).

Auch innerhalb des Zellzyklus ist eine zyklische Änderung der Nukleolengestalt, -anzahl und der Lagebeziehung zu anderen Kernstrukturen zu verzeichnen. GONZALEZ und NARDONE (1968) schildern in Kultur von L-Zellen eine Zunahme der großen Nukleolen gegen Ende der Interphase, die verbunden war mit unregelmäßiger Gestalt, aktiver Bewegung und engem Kontakt der Nukleolen mit der Kernmembran.

Besonders auffällig ist im Interphasekern die enge Lagebeziehung zu den heteropyknotischen Abschnitten. Besonders für die heteropyknotischen Geschlechtschromosomen ist dies seit den ersten Beschreibungen von OHNO, KAPLAN und KINOSITA (1957) bekannt. LIMA DE FARIA, REITALU und O'SULLIVAN (1965) beschreiben allgemein die Beziehung der Chromozentren zum Nukleolus, die besonders gut in den Interphasekernen von Lymphozyten und in den Mundschleimhautkernen des Menschen zu erkennen ist. Dabei sind einer oder mehrere heteropyknotische Blöcke um den oder die Nukleolen zu beobachten. In anderen Kernen kann man zusätzlich zu diesen großen heteropyknotischen Bereichen kleine über den Kern verstreute Chromatinpartikel beobachten. Die Autoren prägen dementsprechend die Begriffe " nucleolus - associated heterochromatin " und " scattered heterochromatin ".

Man weiß heute, daß diese enge Lagebeziehung nicht rein zufällig, sondern durch einen engen funktionellen Zusammenhang gekennzeichnet ist. Wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, stellt der Nukleolus einen hoch leistungsaktiven und daher speziellen physikalischen Zustand eines oder mehrerer Chromosomenbereiche dar. In diesen ist diejenige Erbinformation festge-

legt, welche vor allem die Bildung der Ribosomen determiniert (HSU, BRINKLEY und ARRIGHI, 1967). So konnte an *Xenopus* und *Drosophila* gezeigt werden, daß sämtliches Erbmaterial ("Cistrone"), das diese Aufgabe besitzt, auf einem einzigen Chromosom lokalisiert ist, während bei Ratte, Mensch und chinesischem Hamster bewiesen ist, daß diese Gene auf mehrere Chromosomen verteilt sind (Literatur bei GHOSH und LETTRE, 1970; D.D.BROWN, 1967).

Derjenige Teil dieser Erbsubstanz, der zu einer bestimmten Zeit nicht benötigt wird, ist im Interphasekern an der Bildung des heteropyknotischen Chromatins beteiligt, an den Metaphasechromosomen durch eine Einschnürung der Chromosomenkontur zu erkennen, welche man zur Unterscheidung vom Zentromer (= "primary constriction") auch "secondary constrictions" nennt. Ihre Lokalisation ändert sich von Spezies zu Spezies, bleibt jedoch innerhalb eines Chromosomensatzes weitgehend konstant. Bereits seit HEITZ (1931) kennt man die potentielle Fähigkeit dieser Chromosomenabschnitte, einen Nukleolus ausbilden zu können, die deshalb auch "Nukleolus-organizers" genannt werden (HSU, BRINKLEY und ARRIGHI, 1967).

II. DIE MORPHOLOGISCHE TYPISIERUNG DER ZELLEN NACH IHRER

KERNSTRUKTUR

Die im ersten Abschnitt charakterisierten Kernstrukturen besitzen trotz ihres vielfältigen Gestaltwandels für die meisten Zellarten ein mehr oder weniger typisches Erscheinungsbild. So beschreiben OHNO, KAPLAN und KINOSITA (1957) auf Grund des Vorhandenseins oder Fehlens von Nukleolen, der Anzahl von heteropyknotischen Chromatinstrukturen sowie deren Lagebeziehung zum Nukleolus, ganz eindeutig das Vorhandensein zweier Sorten von Spermatogonien in Mäusehoden. In der einen Sorte stimmt die Zahl der auch in ihrer Größe weitgehend konstanten Chromozentren exakt mit der diploiden Chromosomenzahl ($2n = 40$) überein.

Für alle anderen Gewebesorten desselben Mäusestamms schränken jedoch die Autoren ein, daß eine klare Zellerkennung auf Grund der Variabilität des Chromozentrenmusters nicht möglich ist.

Die bereits an diesen Zellarten klar hervortretenden Unterschiede in der Kernstruktur stehen nicht allein. So hat TSCHERMAK - WOESS (1963) Zellkerne aus der Leber, dem Herzmuskel, der Darmwand und dem Rückenmark der Maus gezeigt, die sich strukturell deutlich unterscheiden. Zu einem entsprechenden Ergebnis kommen auch GRUNDMANN und STEIN (1961), die insgesamt 18 verschiedene Gewebe von Ratte, Maus und Meerschweinchen untersuchten. Dabei zeichnen sich Hinweise auf organspezifische Kernstrukturen ab, die auf Grund der recht großen heteropyknotischen Schollen bei der Maus leichter faßbar werden als bei der in dieser Hinsicht ärmeren Ratte. Diese Organspezifität führt GRUNDMANN und STEIN schließlich zu folgender Aussage:

" gewebsspezifische Kernstrukturen, die es nach einiger Übung und bei streng standardisierter Technik gestatten, die Gewebsdiagnose aus wenigen Kernen zu stellen. Entwicklungsgeschichtlich verwandte Kerne haben eine ähnliche Innenzeichnung, undifferenzierten Kernen fehlen solche Charakteristika" .

Auch SCHMID, SMITH und THEILER (1965) befassen sich mit der Frage nach der Organspezifität verschiedener Chromatinmuster. Es gelingt den Autoren bei *Microtus agrestis* drei verschiedene Kernsorten zu unterscheiden. Milz, Thymus, Lymphknoten, Lunge sowie Knorpel konnten nach ihrem Chromatinmuster nicht klassifiziert werden, da das Kernbild dieser Organe zwei oder sogar drei der Einteilungskriterien entsprach. Andererseits können sehr gut verschiedene Zelltypen eines Organs, z.B. bei der Niere unterschieden werden, so daß auch diese Autoren zum Ergebnis kommen, daß das Chromatinmuster zumindest einen sehr bedeutenden Anteil an der Zellerkennung hat.

Es stellt sich nun die Frage, ob dieser mit einfachen Lichtmikroskopen gewonnene Eindruck soweit objektivierbar ist, daß sich daraus eine präzise Klassifizierung von Zellen nach ihrem Kernbild ableiten läßt.

Die Lösung dieses Problems kann nur mit Verfahren erzielt werden, denen chemische oder physikalische Methoden zugrunde liegen und als solche mit den chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften des untersuchten Stoffes in Wechselwirkung treten. Als Grundlage des dafür notwendigen Verständnisses soll daher zuerst der Aufbau des Chromatingerüstes und anschließend die chemische und physikalische Natur der Bausteine erläutert werden.

III. ZUORDNUNG VON EU- UND HETEROCHROMATIN

(ISO- UND HETEROPIKNOSE) ZU DEN CHROMOSOMEN

Die zytogenetische Forschung beschäftigte sich in den letzten Jahren intensiv mit der Frage nach der Zuordnung der Kernstrukturen zu einzelnen Chromosomen. Mit Hilfe der Autoradiographie (Überblick bei SCHWARZACHER und WOLF, 1970) untersuchten CITOLER und GROPP (1969) Zellkerne von Igel, eine Tiergattung, die besonders ausgeprägte Chromozentren im Interphasekern erkennen läßt. Dabei wurde an Gewebekulturfibroblasten eine Pulsmarkierung (5 min.) durchgeführt, um somit die in der Synthesephase (S-Phase) befindlichen Zellen erkennen zu können. Durch Zählung der Markierungsdichte konnte diese Gruppe weiter unterteilt werden in solche, die sich in der frühen, in der mittleren oder in der späten S-Phase befinden. Letztere Interphasekerne waren zu etwa 24% vertreten und traten durch die im Vergleich zu eupyknотischen Bereichen deutlich stärkere bis fast elektive Färbung der Chromozentren hervor.

Zum Vergleich wurden Markierungsbilder der Metaphasepräparationen von Epithel- und Lymphozytenkulturen hergestellt, denen das ^3H -Thymidin ebenfalls in der späten S-Phase zugesetzt wurde. Unter diesen waren 61% nur an einzelnen Chromosomen, die restlichen 39% diffus markiert. Dies steht in auffälligem Zusammenhang mit dem ebenfalls ziemlich hohen Prozentsatz an Interphasekernen (24%), bei denen die Chromozentren deutlich stärker als das Euchromatin markiert waren. Auf Grund dessen kommen die Autoren zu dem Schluß, daß " die Zuordnung der Chromozentren zu speziellen Autosomen zumindest überaus wahrscheinlich ist ". Dieser Befund wird von GROPP, CITOLER und GEISLER (1969) durch vergleichende Untersuchung an verschiedenen Igelrassen nochmals bekräftigt.

Durch diese Zuordnungsmöglichkeit entstanden zwei weitere Begriffe, nämlich der des fakultativen Heterochromatins und der des konstitutiven Heterochromatins oder, wie man es heute besser bezeichnet, das fakultativ bzw. das konstitutiv heteropyknотische Chromatin. Beispiel für erstere Bezeichnung ist beim

Säuger das "Sexchromatin". Es soll damit zum Ausdruck gebracht werden, daß von zwei homologen Chromosomenabschnitten nur einer heteropyknotisch ist. Im Gegensatz dazu wird mit dem Begriff " Konstitutive Heteropyknose " (= "strukturelle Heteropyknose") die Tatsache bezeichnet, daß beide Homologe heteropyknotisch sind. In entsprechender Weise werden auch die Wortverbindungen " konstitutives " bzw. " strukturelles Heterochromatin " benützt (S.W.BROWN, 1966). In neuerer Zeit konnten diese Begriffe auch durch ihr unterschiedliches Verhalten im Zellzyklus charakterisiert werden. Alle heterochromatischen Abschnitte setzen zwar - mit bestimmten Ausnahmen - später mit ihrer Verdopplung ein als euchromatische Bereiche, jedoch eilt das fakultative Heterochromatin dem konstitutiven Heterochromatin um eine kleine Spanne voraus. (PERA, 1968; SCHMID und LEPPERT, 1969)

IV. DIE BEDEUTUNG DER HETEROPYKNOSE

DARLINGTON diskutierte 1937 als erster die teleologische Bedeutung des Heterochromatins, das damals nur als Substanz angesehen wurde und unserem heutigen Begriff "Heteropyknose" entspricht. Danach dürfte die Rolle des "Heterochromatin" darin bestehen, daß es eine günstige Vorbedingung zur Variation des Karyotyps schafft. SWANSON (1963), sowie JOHN und LEWIS (1968) (Hinweis bei GROPF, CITCLER und GEISLER, 1969) interpretieren die Darlington'sche Auffassung so, daß Form-, Größen- und Zahlveränderungen von Chromosomen am ungefährlichsten an den Zellen des Karyotyps stattfinden können, die bedeutende Heterochromatinblöcke besitzen. Diese Betrachtungsweise, die in erster Linie an Pflanzen entwickelt wurde, schließt von vornherein die Vorstellung der genetischen Inaktivität der heteropyknotischen Strukturen in sich ein.

Diese Auffassung wurde bereits 1932 durch MULLER und PAINTER, sowie 1933 von HEITZ durch Beobachtungen an *Drosophila* begründet, jedoch nur auf Grund der Parallelität des morphologischen Erscheinungsbildes zwischen den heteropyknotischen Strukturen des Interphasekernes und den Chromosomen der Mitosestadien. Letztere wurden nämlich - ohne genauere Beweisführung - während des Teilungsprozesses als genetisch inaktiv angesehen. Die oben genannte Auffassung wird durch Beobachtungen an Meiosefiguren gestützt. Man kann beim Auseinanderrücken (Diakinese) der Chromosomensegmente in Prophase I und Metaphase I Abschnitte erkennen, die streckenweise in inniger Lagebeziehung (Chiasma) zueinander stehen. GROPF und CITCLER (1969) haben an verschiedenen Igelrassen zeigen können, daß eine genaue Übereinstimmung von Strecken deutlicher Chiasmabildung mit nicht-heteropyknotischen Abschnitten besteht. Ein enger Kontakt meiotischer Chromosomensegmente gilt jedoch als Hinweis auf genetische Aktivität der betreffenden Abschnitte.

Ein weiteres, bedeutendes Argument für die genetische Inaktivität stellen die Untersuchungen zur RNS-Syntheseleistung der einzelnen Chromatinbezirke dar. Diese von SIEGER, PERA und SCHWARZACHER (1970 a + b) mit Hilfe der ^3H -Uridin-Markierung

gewonnenen Befunde wurden bereits an früherer Stelle (Seite 4) dargestellt. Der in Chromozentrenregionen festgestellte verminderte Uridineinbau wird von COMINGS (1966, 1970 b) auch für den speziellen Fall des heteropyknotischen X-Chromosoms der meisten Säugetiere bestätigt, obgleich hier bei manchen Spezies die Beurteilung auf Grund des speziellen Aufbaus des heteropyknotischen X-Chromosoms schwierig ist (PERA und WOLF 1967; PERA 1968).

Zum Nachweis aktiver, für Synthesebausteine frei zugänglicher Chromosomenbezirke kann nicht nur die Autoradiographie mit markiertem Uridin herangezogen werden. Diese Methode kann auch für die Prüfung der Bindekapazität von (markiertem) Actinomycin D an die Chromosomenabschnitte Verwendung finden. So konnte bereits BERLOWITZ (1969) am fakultativen Heterochromatin von *Planococcus* zeigen, daß der gesamte väterliche Chromosomensatz (total heteropyknotisch) kein Actinomycin D binden kann, im Gegensatz zum mütterlichen Erbanteil. SCHWARZACHER (1970 a) gelang es, diese Untersuchungsmethode auch bei *Microtus agrestis* anzuwenden. In den Bereichen sowohl fakultativen als auch konstitutiven Heterochromatins zeigt sich deutlich eine verminderte Actinomycinbindung. Genau wie bei den entsprechenden Untersuchungen mit ^3H -Uridin (SIEGER, PERA und SCHWARZACHER, 1970 a + b) ist Anzahl und Größe der nicht markierten Regionen eines Zelltyps zwar konstant, die Lage hängt jedoch nicht von der Koinzidenz mit Heteropyknose ab.

Auch diese letzteren Befunde bestätigen weiterhin die Übereinkunft, der Definition des Begriffs Heterochromatin, außer dem speziellen Replikationsverhalten, nur das Kriterium der genetischen Inaktivität zugrunde zu legen, unabhängig, ob diese mit Heteropyknose verknüpft ist oder nicht.

Im Lichte der heutigen Kenntnis, daß nämlich Heterochromatisierung und Heteropyknose zwei voneinander unabhängige Phänomene darstellen, ist auch die von DARLINGTON begründete Auffassung dahin zu revidieren, daß sie nur Gültigkeit für das Heterochromatin des heutigen Sprachgebrauchs besitzt.

GROPP, CITOLER und GEISLER schreiben 1969:

" Im Heterochromatin finden sich möglicherweise besonders günstige Bedingungen für die Entstehung struktureller Umschichtungen, in erster Linie für Translokationen oder auch für Inversionen. Damit wäre die Heterochromatisierung eines der möglichen Prinzipien für Karyotypänderungen und für Karyotypevolution, vergleichbar mit der Robertson'schen Fusion ".

Die Untersuchungen von SIEGER, PERA und SCHWARZACHER, (1970 a + b) bestätigen den Zusammenhang mit Heterochromatisierungen und mangelnder Transskription, weisen jedoch gleichzeitig darauf hin, daß dabei der Heteropyknose keine prinzipielle Bedeutung zukommt. Es wird diskutiert, ob nicht vielleicht die Heteropyknose einen zusätzlichen Einfluss auf die genetische Inaktivierung ausübt. Dabei wäre denkbar, daß durch die enge Spiralisierung dieser Abschnitte die betreffenden Chromosomensegmente vor anderen Faktoren abgeschirmt werden, die die genetische Inaktivierung beeinflussen könnten.

Spricht man jedoch der Heteropyknose jeden Einfluss auf die Funktion der Chromosomen ab, so kann ihr nur noch die Rolle der Ökonomisierung des vorhandenen Raumes zufallen.

V. AUFBAU UND STRUKTUR DER CHROMOSOMEN

(5.1) Die Nukleinsäuren

Es ist seit Jahrzehnten bekannt, daß die Erbinformation in den Chromosomen lokalisiert ist. Aber erst in den letzten zwanzig Jahren wurden die entscheidenden Erkenntnisse über die chemische Natur von Genen gewonnen. Diese knüpfen an die Entdeckung der Nukleinsäuren in tierischen Zellkernen 1871 von MIESCHER, sowie in pflanzlichen Zellen 1889 von ALTMANN an. Bereits die ersten chemischen Untersuchungen von A.KOSSEL (1911/12 u.1928) liessen erkennen, daß die Nukleinsäuren riesige Molekülgrößen besitzen. Diese Makromoleküle mit Molekulargewichten in der Größenordnung von Millionen bestehen aus Untereinheiten mit einem M.G. von ca. 350. Man nennt diese, durch enzymatische Spaltung darstellbaren Bausteine Nukleotide, die wiederum aus drei Komponenten aufgebaut sind (Überblick bei E.HARBERS, 1969) :

- 1.) eine stickstoffhaltige Base
- 2.) ein Zuckermolekül
- 3.) eine Orthophosphatgruppe

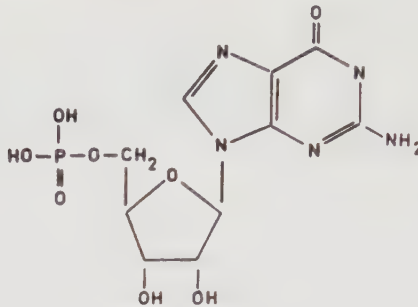
Als Zuckermolekül kommen zwei Pentosen in Frage:

- a) die 2'-desoxyribose
- b) die Ribose

Demgemäß unterscheidet man eine Desoxyribonukleinsäure (DNS) und eine Ribonukleinsäure (RNS). Diese beiden Nukleinsäuren unterscheiden sich weiterhin in den am Aufbau beteiligten Basen. Prinzipiell kommen stets zwei Purin- und zwei Pyrimidinbasen vor:

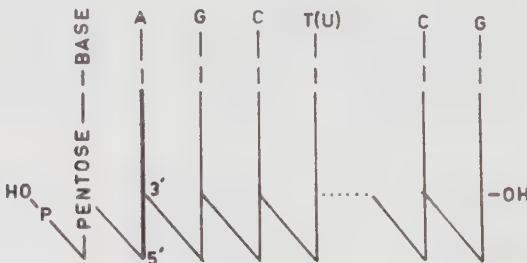
	in der DNS	in der RNS
Purine	Adenin	Adenin
	Guanin	Guanin
Pyrimidine	Cytosin	Cytosin
	Thymin	Uracil

Die Verbindung der drei Komponenten eines Nukleotids zeigt das folgende Beispiel:



Wie sieht nun die großmolekulare Struktur der DNA aus, d.h. wie sind die einzelnen Nukleotide untereinander verknüpft? Das heute allgemein anerkannte Strukturmodell der DNS wurde 1953 im wesentlichen auf Grund der durch WILKINS gewonnenen röntgenographischen und der von CHARGAFF ermittelten chemischen Daten von WATSON und CRICK vorgeschlagen:

Die Nukleotide sind zu einer Kette angeordnet, die alternierend Phosphat und Zucker enthält (3' - 5' - Phospho - diesterbindung) wobei jeweils eine Base an einem Zuckermolekül hängt.



Während das eine Ende der Kette normalerweise mit einem unveresterten Zucker abschließt, steht am anderen Ende eine Phosphatgruppe. Man bezeichnet das Erstere als das 3' - Hydroxylende,

das Letztere als das 5' - Hydroxylende; durch diese Bezeichnung erhält die Kette eine bestimmte Richtung, d.h. eine Polarität.

Das DNS-Molekül in toto besteht schließlich aus zwei Exemplaren der eben beschriebenen Nukleotidkette, die in gegenläufiger Polarität zu einer Doppelspirale umeinander gewunden sind. Je zwei gegenüberliegende Basen bilden dabei mit ihren Nebenvalenzen Wasserstoffbrücken, wobei stets Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin gepaart ist.

Es ist bis heute noch nicht befriedigend geklärt, ob nur eine oder mehrere Doppelhelices am Aufbau der Chromosomen beteiligt sind. Dieses Problem entsteht insbesondere in Hinsicht auf die Tatsache, daß nahe verwandte Organismen zahlreicher Tier- und Pflanzengruppen sich bei ähnlichem Karyotyp im DNS-Gehalt ihrer Genome erheblich voneinander unterscheiden können. Die Ursache dieser während der Evolution entstandenen interspezifischen Unterschiede im DNS-Gehalt wird durch zwei verschiedene Hypothesen erklärt (zitiert nach ULLERICH, 1970):

- " Eine dieser Hypothesen, der die Vorstellung eines polynemen Bauprinzipis der Chromosomen zugrunde liegt, führt die interspezifischen DNS-Differenzen auf eine unterschiedliche Anzahl identischer Längsstrukturen in den Chromosomen der betreffenden Arten zurück ("differentielle Polynemie s. Polytänie"). Nach der anderen Hypothese, die auf dem Einstrang-Modell der Chromosomen basiert, sind die interspezifischen DNS-Differenzen das Resultat während der Evolution eingetretenen Duplikationen von Untereinheiten der chromosomalen DNS ".

Die letztere Hypothese wird zumindest für die Anuren durch zytophotometrische Untersuchungen ULLERICHS (1970) bestätigt. Auch eine Reihe elektronenoptischer Befunde an den verschiedensten Zelltypen tendieren in diese Richtung. Häufig wurden sog. Elementarfibrillen von etwa 100 - 150 Å beobachtet, die sich wiederum aus ca. 30 - 40 Å dünnen Fibrillen zusammensetzen. Wieviele von den letzteren am Aufbau der Elementarfibrillen beteiligt sind, ist umstritten, jedoch spricht kein Befund

dagegen, daß nur eine dünne Fibrille in einer Elementarfibrille enthalten ist und oft nur auf Grund ihrer komplizierten Anordnung für mehrere Exemplare gehalten wird (SCHWARZACHER, 1970 b). Die 30 - 40 Å dünne Fibrille dürfte eine in sich geschraubte DNS - Doppelhelix (Durchmesser ca. 20 Å) sein, die wahrscheinlich durch Anlagerung von Histonen (vide infra) zu einer ca. 40 Å dicken Schraube geformt wird. Auch die Anordnung derselben zur 100 - 150 Å dicken Elementarfibrille wird wahrscheinlich durch Histone als Bindeglieder bewirkt. Die Elementarfibrille wiederum ist vielfach und ziemlich kurz gefaltet und geknäuelte (DAVIES, 1968) und ist nach der Einstranghypothese mit einem Chromatid identisch. Als solches werden die fädigen Strukturen bezeichnet, die aus einem Chromosom (nach Verdopplung in der Replikationsphase) entstehen und jeweils in paariger Anordnung in der Prophase der Zellteilung sichtbar werden. Nach Trennung in der Anaphase verteilen sie sich nicht zufallsgemäß auf die Tochterzellen (COMINGS, 1970 a).

Den Unterschied zwischen iso- und heteropyknotischen Chromosomenanteilen versucht man durch den unterschiedlichen Grad der Spiralisierung zu erklären (RIS, 1945). Dafür spricht, daß in heteropyknotischen Abschnitten der DNS-Gehalt ungefähr doppelt so groß ist als in isopyknotischen (LIMA DE FARIA, 1959) sowie auch die Tatsache, daß in heteropyknotischen Bereichen die Markierungsintensität der Autoradiographie ca. 2-3 mal größer ist, als in den locker strukturierten Kernbezirken (GROPP, CITOLER, GEISLER, 1969).

COMINGS (1970 b) hält jedoch diese Befunde als Täuschung, die durch eine zeitlich einheitlichere Replikation der im Heterochromatin lokalisierten Cistronen als der des Euchromatins bewirkt werden kann. Nach Ansicht von COMINGS (1968) beruht der Unterschied zwischen Iso- und Heteropyknose in der Länge der Chromosomenabschnitte, die von einem Fixpunkt an der Kernmembran ausgehend frei ins Kerninnere flottieren. Dabei sollen heteropyknotische Abschnitte kürzer sein und enger beieinander liegen als isopyknotische Bereiche und daher als m.o.w. kompakte Chromozentren erscheinen.

Wahrscheinlich spielt der Verdrillungszustand der Chromatiden dennoch eine Rolle, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen erkennen lassen. Die dabei sehr konstant zu beobachtenden Schraubenwindungen der Chromosomen, die im Ablaufe der Teilungsphasen immer stärker in Erscheinung treten, zeigen an, " daß in der Packung der Strukturelemente der Chromosomen eine gewisse Ordnung herrscht, die an die Molekularstruktur der DNS anklingt (SCHWARZACHER, 1970 b) ". Auch DU PRAW und BAHR (1969) berichten von Längenmessungen, nach denen sich die Chromatinlänge zur Helixlänge wie 1 : 50 bis über 1 : 100 verhält.

Untersuchungen der neuesten Zeit beschäftigen sich mit dem DNS-Gehalt von konstitutivem (= strukturellem) Heterochromatin, jenem Chromatinanteil also, der je nach Gewebeart in unterschiedlichem Kondensationszustand vorliegen kann. An Mäusezellen konnte gezeigt werden, daß das strukturelle Heterochromatin bis zu 70% mit der sog. "Satelliten-DNS" identisch ist (YASMINEH und YUNIS, 1970 a + b; 1971). MAZRIMAS und HATCH (1970) bestimmten durch chemische Auftrennung (Übersicht bei HARBERS, LEDERER et al, 1968 a) in den Leberzellkernen von Ratten 57,5 % des Chromatins als Heterochromatin und zeigten, daß in dieser Fraktion 75 % der "Satelliten-DNS" lokalisiert ist.

Letzterer Begriff entstand aus biochemischen Untersuchungen, speziell aus Beobachtungen bei der CsCl - gradientenzentrifugation. Dabei liegt die Zentrifugierbande dieser DNS-Fraktion bedeutend über der Bande sonstiger DNS ("Satellitbande"). Dies ist ein Kennzeichen für den Besitz eines niedrigeren Molekulargewichts als DNS üblicherweise besitzt und gleichzeitig ein Indiz auf einen m.o.w. uniformen Aufbau. Auch die leichte Renaturisierbarkeit dieser DNS-Fraktion spricht für eine Zusammensetzung aus sich wiederholenden Basensequenzen. Wenn man diesen Befund von YASMINEH und YUNIS (1970 a + b; 1971) für das strukturelle Heterochromatin aller Spezies verallgemeinern darf, so wäre damit eine Erklärungsmöglichkeit für die Chromozentrenbildung gegeben. Das Vorliegen reiterierender Basensequenzen bietet nämlich ein Maximum an Möglichkeit

zur Hybridisierung zwischen DNS-Strängen homologer und auch nicht homologer Chromosomen. Dies hätte in erster Linie Bedeutung für das lokale Austauschen kleiner Chromosomenstücke, z.B. bei der Reparatur von Gendefekten. Damit wäre auch der Befund von NATARAJAN und AHNSTROM (1969) in Einklang zu bringen; diese Autoren beschreiben das Heterochromatin als Hauptort für mutagene Schäden durch Strahlen oder Chemikalien.

(5.2) Die Histone

Weitere wesentliche Bestandteile des Zellkerns außer der DNS und der RNS (zusammen ca. 12% des Kerngewichts bei Säugetierzellen) sind nichtchromosomale, globuläre Proteine (hauptsächlich Enzyme, ca. 75% des Kerngewichts) sowie basische Proteine (Histone, ca. 12%). (RICHARDS und PARDON, 1970). Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen Histontypen: die lysinreichen Histone, die argininreichen Histone, sowie ein weiterer Typ, der eine Mittelstellung zwischen den beiden ersteren einnimmt. Es ist auffallend, daß parallel zur DNS der Gehalt an Histon pro Zellkern recht konstant ist und daß zwischen diesen beiden Kernsubstanzen ein Verhältnis von 0,8 - 1,5 : 1 besteht (UMANO, UPDIKE und DOUNCE, 1962).

Weiterhin ist erwähnenswert, daß die Histonsynthese der DNS-Replikation (vide infra!) vorausgeht (BLACK, ANSLEY und MANDL 1964), sowie die Tatsache, daß Histone im Verhältnis 1 : 1 zur DNS diese aus einer Lösung vollständig zur Ausfällung bringen können (Literatur bei JOHNS und HOARE, 1970). Letzterer Befund spricht für eine natürliche Assoziation der Histone an die DNS. Mit Hilfe der Hybridisierungsmethode und zytochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, daß für bestimmte Histonfraktionen aus verschiedenen Organen und aus verschiedenen Organismen eine große stammesgeschichtliche Stabilität existiert, z.B. besitzt eine bestimmte argininreiche Fraktion praktisch dieselbe Aminosäuresequenz in Kalbsthymus und Erbsensamen (DE IANGE und SMITH, 1968). Andererseits sind besonders die lysinreichen Histone von Fall zu Fall recht unterschiedlich. Ebenso zeigen bestimmte Histonfraktionen unterschiedliche Affinität zu DNS verschiedener Herkunft. HUANG

und BONNER (1965) vermuten spezielle RNS-Moleküle, die mit einem größeren Histonaggregat assoziiert sind und die spezifische Bindung zur DNS herstellen.

Man sieht heute, gemäß der von STEDMAN und STEDEMAN (1950) aufgestellten Hypothese, die Bedeutung der Histone als dynamische Regulatoren des genetischen Potentials. Man stellt sich dabei vor, daß die Histone als die durch die Umwelt wandelbare Fraktion des Nukleoproteins Änderungen des Milieus in eine veränderte DNS-abhängige RNS-Synthese übersetzen. In Einklang mit dieser Hypothese stehen die Befunde von HUANG und BONNER (1962) sowie ALLFREY, LITTAU, MIRSKY (1963), die eine deutliche Abnahme der DNS-abhängigen RNS-Synthese durch differentielle Blockierung des Genoms mit Histon erreichten (Überblick bei JOHNS und HCARE, 1970).

Eine Fortführung der Stedmanschen Hypothese ist die Rolle, die man den Histonen bei der Gewebsdifferenzierung zuteilt. In diesem Sinne ist die Differenzierung einer Zelle nicht als Ergebnis der Zunahme genetischer Potenzen zu verstehen, sondern eher als eine selektive Unterdrückung von Potenzen (BLACK, ANSLEY und MANDL, 1964).

VI. DER DNS - GEHALT SOMATISCHER GEWEBE

(6.1) Allgemeine Gesetzmäßigkeit der DNS-Konstanz

Untersucht man die Zellen eines normalen Gewebes, das nur eine geringe, sich in physiologischen Grenzen bewegend Teilungsaktivität besitzt, auf ihre Chromosomenanzahl, sowie auf den Gesamt-DNS-Gehalt, so ist eine deutliche Diskrepanz zwischen diesen beiden Kriterien festzustellen. Während nämlich die Chromosomenzahl selbst zwischen eng verwandten Spezies beträchtliche Unterschiede aufweist, kann bei den meisten Säugetieren ein konstanter DNS-Gehalt von ca. $7 \cdot 10^{-9}$ mg pro Zellkern festgestellt werden (ATHIL, BEGAR, CHIC, 1965). Diese Konstanz gilt auch für alle somatischen Gewebe eines Individuums, unabhängig von der entwicklungsgeschichtlichen Herkunft (LEUCHTENBERGER C. und R., 1966). Die Zellen der Keimreihe, die aus der Reifeteilung (Meiose) hervorgegangen sind, weisen dagegen nur die Hälfte der DNS-Menge auf als die übrigen Gewebe, jedoch ist auch hier eine Konstanz zwischen verschiedenen Spezies zu verzeichnen (ALFERT, 1950). Ebenfalls ist in diesen Zellen die strenge Korrelation zur Chromosomenzahl bemerkenswert, welche ebenfalls auf die Hälfte reduziert ist.

Als Beispiel seien die DNS-Werte des Rindes genannt, die rund $64-66 \cdot 10^{-13}$ g pro Zellkern betragen, während sich der DNS-Gehalt der Spermien auf ca. $33 \cdot 10^{-13}$ g beläuft (SANDRITTER, 1966).

Daneben gibt es noch Gewebe, z.B. die Leber, welche neben Zellen mit normalem, doppeltem Chromosomensatz auch Zellen mit dem 3-, 4-, 5-, 6-, 7- und 8-fachen Chromosomensatz enthalten und sogar auch Zellen mit einem einfachen Satz. Schließlich treten in beträchtlicher Menge auch solche Zellen auf, deren Chromosomensatz nicht einem geraden Vielfachen des einfachen Satzes entspricht (MARQUARDT und GLÄSS, 1957):

	1n	2n	3n	4n	5n	6n	7n	8n	Aneuploid
%	8,2	44,5	9,6	18,7	2,9	1,9	1,0	0,6	12,6

In all diesen Zellen kann auch eine strenge positive Propor-

tionalität zwischen Chromosomenanzahl und DNS-Menge festgestellt werden.

Man bezeichnet Zellen mit dem normalen, väterlichen und mütterlichen Chromosomensatz als diploid, demgemäß Spermien als haploid und die geraden Vielfachen des einfachen Chromosomensatzes als tri-, tetra-, pentaploid usw. Alle Zellen mit einem ungeraden Vielfachen des haploiden Satzes werden unter dem Begriff "aneuploid" zusammengefaßt.

Dieselben Bezeichnungen werden auch verwendet, um die entsprechende Änderung der DNS-Menge zu charakterisieren.

Das Konzept der DNS-Konstanz in sich nicht teilender Zellen wurde durch vielfältige Untersuchungen an menschlichen und tierischen Geweben von LEUCHTENBERGER D. (1958), LEUCHTENBERGER C. u. R. (1966), SCHRADER und LEUCHTENBERGER (1950), SANDRITTER, MÜLLER und GENSECKE (1960) erhärtet. Weiterhin existieren auch rein biochemische Untersuchungen von DAVIDSON und WAYMOUTH (1943) sowie von KOSTERLITZ (1947) (Literatur bei LEUCHTENBERGER C.u.R., 1966), die insbesondere die Konstanz der DNS unabhängig von der Proteinsynthese bestätigen.

(6.2) Variation im Generationszyklus

Übersicht bei GRUNDMANN (1964)

und BASERGA (1968)

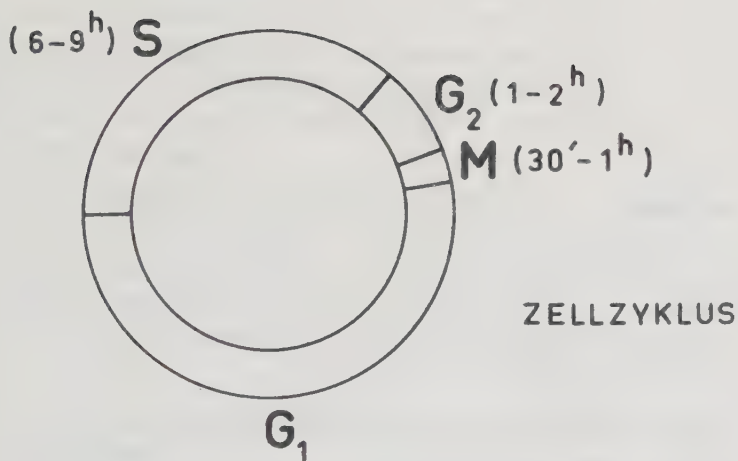
Vergleicht man den DNS-Gehalt von Zellen oder Geweben miteinander, die eine unterschiedliche Mitoseaktivität besitzen, so führt dies zu voneinander abweichenden Ergebnissen. Diese Unterschiede werden bedingt durch wechselnde Stoffwechsellaage, die durch jede Form einer Stimulation hervorgerufen werden kann. Ein Organ reagiert darauf in zweifacher Weise: einmal durch einen Aktivitätsanstieg jeder einzelnen Zelle und weiterhin auch durch ein Vermehren der Anzahl der funktionstüchtigen Zellen. Letzteres Ziel wird durch die Erhöhung der Mitoseaktivität erreicht. Da jedoch beide Reaktionen fast gleichzeitig erfolgen, ist es gerade deshalb schwer, sie in irgend einer Weise auseinander zu halten.

Die Mitose läuft in ihren verschiedenen, morphologisch sichtbaren Stadien in der Regel in einer Stunde ab (MITTERMAYER, LEDERER, KADEN und SANDRITTER, 1968). Die Zeit zwischen zwei Mitosen wird die Zykluszeit (T_c) oder Generationsdauer genannt, sie hängt sowohl von der Zellart, als auch von dem Leistungszustand derselben ab. Da die physiologische Zellmauserung einen Zellverlust darstellt, der durch Zellteilungen wieder ausgeglichen wird, besteht ein sogenanntes Fließgleichgewicht. Ist das Gleichgewicht z.B. durch irgend einen Schaden gestört, dann werden auch die regenerativen Zellteilungen entsprechend dem gesetzten Schaden häufiger eintreten. Es gibt nun Gewebearten (die sog. Wechselschleimgewebe), deren Generationszeit sehr kurz ist, z.B. die Zellen des hämatopoetischen Systems und demgegenüber andere Zellarten, die wie die Nervenzellen teilungsunfähig lebenslang in der postmitotischen Phase (G_0) verweilen.

Durch die Entwicklung autoradiographischer Methoden wurde auch die Bestimmung der einzelnen Intermitosephasen möglich.

Zellen, die ihre Teilungsfähigkeit beibehalten, treten nach einer zellindividuell verschieden langen postmitotischen Phase G_1 in die S-Phase ein (Synthese der DNS) und bereiten sich dadurch auf die Zellteilung vor. In dieser Periode wird die für die identische Reduplikation des genetischen Materials erforderliche DNS mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 0,5 - 1,0 μ Helix/min. synthetisiert (CAIRNS, 1966; HUBERMANN und RIGGS, 1968).

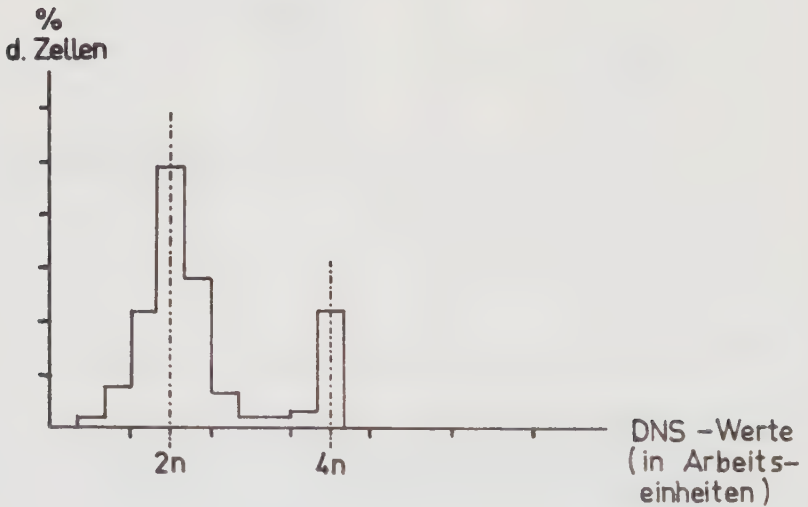
MITTERMAYER, LEDERER, KADEN und SANDRITTER (1968) beobachten eine schnellere Replikation im 2. und 3. Drittel der S-Phase als zu Beginn und diskutieren, ob dies nicht auf die unterschiedliche Geschwindigkeit in den verschiedenen Chromatinabschnitten zurückgeführt werden kann. Interessanterweise kommt es in dieser Phase zu keiner Entspiralisierung des Heterochromatins, d.h. die DNS-Synthese kann auch im kondensierten Zustand ablaufen (KLINGER, SCHWARZACHER und WEISS, 1967; PERA und WOLF, 1967; HEIL, 1970).



Für die DNS-Synthese benötigen die Zellen verschiedener Gewebearten nahezu einheitlich 6-8 Stunden, sie weist also eine bemerkenswerte Konstanz auf (MAURER und KOBURG, 1961).

Auch die ihr folgende Prämitosephase (G_2) läßt unter normalen Verhältnissen nur eine geringe Varianz erkennen (1-2 Stunden), wird jedoch durch Strahleneinwirkung u.ä. beträchtlich verlängert (BENASSI und PICOTTI, 1970).

Aus dieser Schilderung ist zu entnehmen, daß die Zunahme der DNS gerade zu der Zeit erfolgt, in welcher der Kern keine morphologische Änderung erkennen läßt und somit auch nicht die Zyklusphase für den Einzelfall exakt bestimmt werden kann. Die bestmögliche Aussagekraft - jedoch nur für eine Vielzahl von Zellen - wird mit Hilfe eines sog. Gesamt-DNS-Verteilungsmusters erreicht. Zu diesem Zweck werden die absoluten (oder relativen) DNS-Werte gegen die (Prozent-)Zahl der untersuchten Zellen in Diagrammform aufgetragen. Ein Gewebe zeigt dann, je nach seiner Proliferationstendenz, zwei m.o.w. deutlich ausgeprägte Häufigkeitsgipfel.



Der erste Gipfel entspricht den diploiden G_1 -Zellen, der zweite Gipfel liegt ungefähr beim doppelten DNS-Gehalt und entspricht den tetraploiden Zellen der G_2 -Phase. Die Streuwerte zwischen diesen beiden Gipfeln repräsentieren die Zellen, welche sich in der Reduplikationsphase S befinden.

Man muß sich darüber im klaren sein, daß nur dann von einer "vermehrten" DNS gesprochen werden kann, wenn der DNS-Gehalt der Zellen in G_1 - Phase - und nur dieser Zellen - mit demjenigen eines Vergleichssystems in Beziehung gesetzt wird.

Dabei müssen sich die Kontrollzellen möglichst auf demselben Objektträger befinden, wie das zu untersuchende Material und sie müssen einen bekannten DNS-Wert haben. Mitteilungen über das Vorkommen einer zusätzlichen DNS haben nur dann Gewicht, wenn völlig fehlerfreie Untersuchungen seitens des Instruments und der Vorbehandlung des Objekts an Zellen mit bekannter Chromosomenzahl durchgeführt werden, die sicher nicht in der S-Phase stehen.

Diese prinzipiellen Erwägungen haben auch Geltung für Gewebe, in denen eine pathologische Erhöhung des DNS-Gehaltes gefunden wird und diesem Befund eine nosologische Bedeutung zugeschrieben werden soll. Dies gilt vor allem für die an späterer Stelle zu erörternde Besonderheit von Geschwülsten.

(6.3) Variation infolge unterschiedlicher metabolischer Aktivität.

Insbesondere mit Hilfe der Mikrospektrophotometrie konnten Befunde erhoben werden, die mit dem Konzept der DNS-Konstanz nicht zu übereinstimmen scheinen. Hierbei handelt es sich vornehmlich um Schwankungen des DNS-Gehalts, die eine Abhängigkeit von der Stoffwechsellage des Untersuchungsobjektes vermuten lassen (Überblick bei ROELS 1966). Solches wurde zuerst von LEUCHTENBERGER und SCHRADER (1952) an den Speicheldrüsenkernen von Schnecken, sowie 1953 von GOVAERT an den Spermatozyten I von Fasciola festgestellt. Weitere Berichte befassen sich mit den extrachromosomalen DNS-Körpern der Geschlechtszellen von Tipula und Melanoplus (LIMA DE FARIA, 1962), mit dem wechselnden DNS-Gehalt der Leber des Fisches Lebistes reticulatus (FAUTREZ und MOERMANN, 1953) und schließlich mit den Zellen unterschiedlicher Differenzierung von Paracentrotus lividus (LISON und PASTEELS, 1951). THOMSON et al (1953), sowie LAQUERRIÈRE (1957, 1958) fanden mikrospektrophotometrisch einen erhöhten DNS-Gehalt während der Regeneration an der Leber von Maus und Meerschweinchen.

Neuere Untersuchungen liegen vor von VICIA-MAGNI (1965) und PELIC und VICIA MAGNI (1969), die ebenfalls auf mikrospektrophotometrischem Weg, aber auch durch Mikrointerferometrie, sowie mit chemischen Methoden zu Abweichungen des DNS-Gehaltes je nach der Stoffwechsellaage kommen. Als Versuchstier verwendeten die Autoren Ratten, die täglich bis zu 15 Std. bei 4°C gehalten wurden. Dabei nahm der DNS-Gehalt in den Zellen des Keimblieders (die sich beim erwachsenen Tier nicht mehr vermehren) binnen einer Versuchsperiode von insgesamt 100 bzw. 300 Stunden um 24 bis 40% ab. Nach Aussetzen des Kälteschocks erholen sich die DNS-Werte binnen 60 Tage wieder und können z.T. auch höhere Werte erlangen als zu Versuchsbeginn. Dabei ist für die Interpretation bedeutsam, daß in der Rekonvaleszenzphase keine Mitosen, auch nicht nach Colchizinbehandlung und anschließender mikroskopischer Betrachtung, zu sehen sind. ALFERT und SWIFT (1953), sowie PATAU und SWIFT (1953) haben die Bedeutung der von der DNS-Konstanz abweichenden Befunde vollkommen verneint und sie auf Meßfehler zurückgeführt, wie sie bei ungleichmäßiger Dichte eines Objektes zweifellos entstehen können. Die hier beschriebenen Abweichungen wurden jedoch an Objekten erhoben, die nach genau denselben Methoden behandelt wurden, wie diejenigen Gewebe, deren Meßwerte für die DNS-Konstanz sprechen. Weiterhin wurden zum Vergleich unterschiedliche Spektrophotometrierverfahren angewendet, bei denen der Inhomogenitätsfehler unberücksichtigt bleiben kann (siehe später!) und dennoch ist kein Unterschied der Meßergebnisse festzustellen.

ROELS (1966) vertritt die Auffassung, daß eine Zunahme des DNS-Gehaltes durchaus bei erhöhter Stoffwechselaktivität denkbar ist, daß es also eine sog. "metabolische DNS" gibt. ROELS verweist hierbei auf die von RUDKIN und CORLETTE (1957) an Chromosomenpuffs von Insekten festgestellte DNS-Zunahme und diskutiert, ob nicht dazu eine Parallele in der Tatsache zu erblicken ist, daß in Säugetierkernen der DNS-Gehalt des Nukleolusapparats in aktiven Drüsen 45% größer als in inaktiven Drüsen ist und daß gleichzeitig der DNS-Gehalt des den Nukleolus umgebenden Chromatins um ca. 6% zunimmt. Durch diese

Befunde ist klar gezeigt, daß in bestimmten Chromosomenabschnitten eine DNS-Synthese auf Grund der Stimulation einer bestimmten Zellfunktion erfolgen kann.

Das Konzept von ROELS erfährt in jüngerer Zeit weitere Unterstützung durch autoradiographisch erhobene Befunde. Wenn nämlich eine unbedingte DNS-Konstanz existieren würde, müßte eine Kurzzeitmarkierung einer Zellpopulation zu einer Verdopplung der markierten Zellen nach jedem Mitosezyklus führen. Gleichzeitig müßte in derselben Zeit die durchschnittliche Anzahl der Silberkörner pro Zelle stets halbiert worden sein. Überhaupt keine Markierung dürfte in den Zellen zu finden sein, die im Zuge einer Differenzierung bereits ihre letzte Teilung beendet haben.

Von allen hier aufgezählten Punkten wurden jedoch Abweichungen gefunden.

APPLETON, PELC und TARBIT (1969) untersuchten die Zellproliferation des Darmschleimhautepithels erwachsener Mäuse mit der ^3H -Thymidinmarkierung. Das nicht im Zellstoffwechsel metabolisierte ^3H -Thymidin wird dabei nach spätestens 40-60 Minuten inaktiviert. Die Autoren zählten in den Kryptenzellen derjenigen Tiere, die 40 min. nach der Thymidinapplikation untersucht wurden, 13.4 ± 0.6 Silberkörner pro Zellkern, während nach 24 Stunden die Zottenzellkerne immer noch 12.1 ± 0.5 Silberkörner enthielten, anstatt wie zu erwarten wäre, 6.7. Daraus wird der Schluß abgeleitet, daß im Jejunum der Maus die Zellen auch nach ihrer letzten Teilung noch Thymidin einbauen, bevor sie also endgültig ausdifferenzieren und in die Zotten wandern. Es wurde weiterhin berechnet, daß 24 Stunden nach der Thymidinapplikation ungefähr 70-78% der markierten Zottenzellen zu dieser Kategorie zählen und daß die anfänglich markierten Zellen während ihrer Wanderung 32% der markierten DNS verlieren, die demnach im Sinne von ROELS (1966) als metabolische DNS angesprochen wird.

Mit einer ähnlichen Methode untersuchte OWEN (1963) die Entwicklung von Präosteoblasten zum Osteozyten bei ca. 2 Wochen alten Kaninchen. Es konnte von der Autorin festgestellt werden,

daß eine große Anzahl Osteoblasten Thymidin aufnehmen und sich auch die nächsten 3-4 Tage nicht teilen, obwohl dieses Ereignis, gemäß der Berechnung der $G_2 + M$ -Periode bei diesen Zellen, in diesem Zeitabschnitt hätte bereits erfolgen müssen. Gleichzeitig scheinen sich auch einige markierte Osteoblasten zu Osteozyten entwickelt zu haben ohne sich zu teilen.

Sehr aufschlußreich erwiesen sich weiterhin die Untersuchungen von STRCUN, CHARLES, ANKER und PELC (1967), welche an Mäusen an die 3H -Thymidinmarkierung eine chromatographische Aufgliederung der DNS in zwei Fraktionen anschlossen; dabei wurde die spezifische Radioaktivität der DNS mit einem Molekulargewicht kleiner als $4 \cdot 10^6$ bestimmt sowie auch der DNS mit größerem Molekulargewicht. Bei erwachsenen Mäusen war die spezifische Aktivität der niedermolekularen DNS-Fraktion in der Muskulatur 14 mal größer als die der schweren Fraktion. Im Dünndarm lag dieses Verhältnis bei 4,6. Diese Unterschiede können nicht durch die Depolymerisierung von markierter, hochmolekularer DNS erklärt werden, da depolymerisierte DNS in bestimmten Grenzen dieselbe spezifische Aktivität wie hochpolymere DNS besitzen müßte. Demnach bleibt als einzige Erklärung, daß 25% der markierten Zellen einen DNS-Metabolismus besitzen und die daran teilnehmende Menge ca. 36-43% der Gesamt-DNS beträgt. Die "metabolische DNS" wäre außerdem durch ein sehr niedriges Molekulargewicht gekennzeichnet.

ZUSAMMENFASSUNG:

All diese experimentellen Daten führen in Abrundung zu der Vorstellung der metabolischen DNS, die auch "redundante DNS", "Extra-DNS" oder als "gene amplification" bezeichnet wird. Mit letzterer Bezeichnung klingt schon eine Hypothese an, die mit dem Begriff "metabolische DNS" verbunden wird: demnach soll diese DNS-Fraktion aus überzähligen Kopien der Gene bestehen, die in einem bestimmten Zelltyp aktiv sind. Die metabolische DNS ist die arbeitende DNS, welche für die Transkription zur RNS und womöglich auch für andere Aufgaben bereitsteht. Indem sie also aktiv ist, unterliegt sie mehr den

Abbaumechanismen und wird ständig erneuert (PEIC, 1968). Diese Vorstellung steht auch in Einklang mit den Hybridisierungsversuchen von D.D.BROWN (1967), der berichtet, daß E. coli sechs Genkopien der DNS besitzt, welche mit r - RNS hybridisieren, während diese Anzahl bei Hühnern 200 und bei Hela-Zellen 440 beträgt. ROELS (1966) sieht in dem Vorkommen überschüssiger DNS eine Verstärkung der Informationsfähigkeit des genetischen Materials, da dadurch eine Vielzahl von Transskriptionen zur selben Zeit möglich werden.

VII. DIE GESETZMÄSSIGE ANORDNUNG DES CHROMATINS IM INTERPHASEKERN

Bereits an früherer Stelle wurde die Tatsache erwähnt, daß die Sexchromatinkörperchen in den Interphasekernen meist peripher an der Kernmembran zu finden sind. Dieser Befund läßt sich bei den meisten Tieren u.a. auch beim Menschen nicht näher präzisieren oder gar objektivieren, da das Sexchromatin meist von relativ kleiner Größe ist. Eine gute Beschreibung der peripheren Lage des Sexchromatins gewähren jedoch diejenigen Tierarten, bei denen es ziemlich gut ausgeprägt ist. Hierbei kommen insbesondere Spezies aus der Familie der Nager in Frage, wie z.B. die von PERA (1969) eingehend darauf untersuchte Erdmaus (*Microtus agrestis*). Bei diesem Tier liegt das Heterochromatin nicht wie bei vielen anderen Tierarten in kleineren Abschnitten auf fast allen Chromosomen verteilt, sondern liegt in zusammenhängenden Blöcken fast ausschließlich auf den beiden Geschlechtschromosomen (SCHMID, 1967). Die Untersuchungen von PERA (1969) bestätigen diesen Befund, ebenso wie die von GROPP und CITOLA (1969) geschilderte Beobachtung, daß die Ausbildung der beiden Chromozentren nicht zyklusgebunden ist.

PERA (1969) beschreibt weiterhin das Auftreten von Chromozentrenfusion in einem Teil der im Ausstrich untersuchten Zellen. Auch die randständige Lage des Sexchromatins wird in dieser Arbeit bestätigt; bei 12% derjenigen Kerne, die Chromozentrenfusion aufweisen, wird auch von einer Abweichung der randständigen Lage berichtet. Ob jedoch dieses eine Chromozentrum dann an den Nucleolus assoziiert ist, konnte aus technischen Gründen nicht dargestellt werden. Auch die sonstigen Positionen der beiden Chromozentren sind nicht zufallsgemäß verteilt, sondern es läßt sich eine Häufung sowohl der eng benachbarten als auch der polaren Lage beobachten.

PERA kommt auf Grund dieser Beobachtungen zur Schlußfolgerung, daß die spezifische Lage der Chromozentren fixiert ist. Nimmt man diese als Indikator für die Position der analogen Chromosomen, so ist demnach auch diese fixiert. Dieses von PERA an

Hand des Geschlechtschromatin gefundene Ergebnis wird bestätigt durch EVANS und BIGGER (1961), welche durch γ -Bestrahlung von *Vicia faba* Austausch von Chromosomenstücken induzierten. Sie fanden dabei eine Austauschhäufigkeit zwischen metazentrischen (M.) und submetazentrischen (S.) Chromosomen von 1 : 3,44, während das Längenverhältnis dieser beiden Chromosomenarten nur 1 : 2,16 beträgt. Es scheint also eine Exponiertheit der S-Chromosomen vorzuliegen, wobei bei diesen auch innerhalb eines Chromosoms bestimmte Abschnitte bevorzugt werden, ganz im Gegensatz zu den M-Chromosomen. Die Tatsache schließlich, daß Zellen mit tetraploidem Chromosomensatz nur dreimal so große Austauschhäufigkeit aufweisen als diploide Zellen, führen die Autoren als Beweis für die bereits von früheren Autoren erhobene Annahme an, daß nur wenig Chromosomenbewegung im Interphasekern stattfindet.

Auch NATARAJAN und AHNSTRÖM bestätigen 1969, daß einer der wichtigsten Faktoren, welche die Verteilung von Chromosomen- oder Chromatidenveränderungen bestimmen, in der Organisation der Chromosomen im Interphasekern zu suchen ist. " Da der größte Teil der Syntheseleistung, einschließlich dem Ausbessern von Schäden chemischer oder strahlenbedingter Ursache, im Interphasekern stattfindet, wird durch die Anordnung der Chromosomen zueinander, sowie durch die Polarisierung der Chromosomen und durch den Karyotyp bestimmt, wie nah aneinander die gesetzten Schäden liegen, um schließlich in einer Störung ihren Ausdruck zu finden. Die Tatsache, daß man die Häufigkeit von Chromosomenstörungen bei einer bestimmten Dosis (eines Mutagens) dadurch ändern kann, indem man die in der Interphase im Kern vorhandene Ordnung stört, beispielsweise durch Zentrifugieren, charakterisiert diesen Standpunkt hinreichend ".

Bei diesen Zentrifugierexperimenten konnte von PUSA (1963) (Hinweis bei COMINGS, 1968) ein sehr interessanter Befund erhoben werden. In Pflanzenzellen wurde nämlich die Anheftung der Chromosomenenden an die Kernmembran nachgewiesen. Dasselbe Ergebnis erbrachten in der folgenden Zeit elektronenmikroskopische Aufnahmen von DU PRAW (1965) und WOOLLAM (1967)

(Hinweis bei COMINGS, 1968), sowie von COMINGS und OKADA (1970 a) an Metaphase- und Anaphasechromosomen. COMINGS und OKADA (1970 b) berichten auch von solchen Aufnahmen an Fibroblastenkulturen des Indischen Büffels (Indian mutjak), welche deutliche Kondensationsbezirke von Prophasechromosomen an der Kernmembran zeigen.

Bei diesen Untersuchungen ergibt sich noch ein weiterer interessanter zytologischer Aspekt: Bei der im Zygotän der Meiose erfolgenden Synapsis, als Vorbereitung zum Crossover und zur Chiasmabildung kann beobachtet werden, daß die Aneinanderlagerung homologer Chromosomen oft von den Enden her beginnt, die offenbar an der Kernmembran angeknüpft sind (WOOLAM, MILLER und FORD, 1967). Es entsteht der sog. synaptische Komplex, eine Doppelstruktur, in der die Paarungspartner einen allgemein recht konstanten Abstand von $0,1 - 0,15 \mu$ einhalten (Überblick bei COMINGS und OKADA, 1970 c).

Bei Dipteren findet man ein ähnliches Phänomen auch in den Äquatorialplatten von Mitosen. Die homologen Chromosomen liegen hier zwar nicht gepaart, jedoch in offensichtlich geordneter Nachbarschaft gelegen, was auf einen ähnlich geordneten Zustand in der Interphase schließen läßt (somatische Paarung).

Metaphasefiguren höherer Organismen lassen eine derartige enge Nachbarschaft homologer Chromosomen, wie sie bei Dipteren gefunden wird und hier sogar zu einem mitotischen Crossover führen kann, vermissen. Dennoch scheint auch hier eine gewisse Ordnung vorzuliegen. So beschreiben GROPP und ODUNJO (1963) bei der Chromosomenanalyse von kultivierten menschlichen Lymphozyten eine auffällige Häufung ähnlich geformter Gestaltsvarianten bei homologen Chromosomen. Die Autoren diskutieren die prinzipielle Möglichkeit, daß solche Gestaltsveränderungen durch das Einwirken des Colcemids bedingt sein könnten. Die Autoren geben aber zu bedenken, daß solche Kräfte regelloser Art nur dann zu konkordanten Veränderungen führen, wenn vor der Einwirkung von Quellungskräften die betroffenen Chromosomen in gleicher Weise dafür exponiert waren. Der Versuch einer Erklärung führt in Anlehnung an die Verhältnisse bei den Dipteren zu der Hypothese der somatischen Paarung homologer Chro-

mosomen beim Menschen. Zu einem identischen Ergebnis gelangen SHAW und COHEN (1965), die die Häufigkeit von Chromosomenaustausch nach Mitomycinbehandlung menschlicher Leukozyten untersuchten. Die Untersuchungen zeigen, daß allgemein tatsächliche oder scheinbare Homologe bevorzugt sind, darunter insbesondere das Autosomenpaar 1 und 9.

Die aus der Hypothese von der somatischen Paarung homologer Chromosomen resultierende Schlußfolgerung vom Vorliegen einer geordneten Chromosomenanordnung wird durch MILLER, MUKHERJEE und BREG (1963 a + b) bestätigt. Diese Autoren legen ein ähnliches Konzept vor, das die nicht zufallsgemäße Verteilung der Chromosomen in Metaphaseplatten beweist. In den zu diesem Zweck ausgemessenen Metaphaseplatten menschlicher Zellen konnte jedes Chromosom, bzw. Chromosomenpaar oder -gruppe auf Grund seines Abstandes vom Zentrum oder auf Grund seines peripheren Auftretens angesprochen werden. Dabei lag das Y-Chromosom am häufigsten peripher, gefolgt vom Paar 21 und Gruppe 17-18. Die Chromosomen 1, 2, sowie 19 und 20 waren meist im Zentrum anzutreffen.

Eine endgültige Bestätigung des Konzepts von der gesetzmäßigen Anordnung der Chromosomen wird durch neuere molekularbiologische Aspekte geliefert: Es wurde bereits an früherer Stelle näher ausgeführt, daß die Autoradiographie von Gewebekulturzellen zeigt, daß die Replikation nicht gleichzeitig für alle Chromosomen und auch nicht gleichzeitig für alle Abschnitte eines Chromosoms erfolgt. Bestimmte Abschnitte bestimmter Chromosomen werden stets früh, andere spät repliziert. Die Verdoppelung der DNS einzelner Chromosomen findet also offenbar weder gleichzeitig, noch in zufälliger Folge, sondern nach einem wohlgeordneten Zeitschema statt. Weitere Schlüsse auf die Replikationsweise von Chromosomen erlaubten autoradiographische Versuche, die nicht mit intakten, sondern mit durch Detergenzbehandlung schonend dissoziierten Chromosomen durchgeführt wurden (HUBERMAN, 1968). Dieses Verfahren ermöglichte autoradiographische Aufnahmen von ausgestreckten einzelnen DNS-Molekülen. Auch wurden die Präparationen so behandelt, daß die Syntheserichtung der DNS aus dem Autoradio-

gramm ersichtlich wurde. Zu diesem Zweck bekamen die Zellen Tritium-markiertes Thymidin für 30 min. angeboten. Dann wurde dem Medium nicht-radioaktives Thymidin in großem Überschuß zugegeben. Verständlicherweise benützen diejenigen Chromosomenabschnitte, welche sich zu, bzw. ab diesem Zeitpunkt (30. Minute) in der Replikation befinden, weitaus weniger markiertes Thymidin als die frühreplizierenden Abschnitte. Somit wird im Autoradiogramm die Richtung der Replikation durch die abnehmende Dichte der Silberkörner dargestellt. Als Befund ergab sich (HUBERMAN, 1968; HUBERMAN und RIGGS, 1968), daß die Replikation eines DNS-Fadens an mehreren Stellen gleichzeitig beginnt und von diesen Stellen aus in entgegengesetzter Richtung verläuft. Die meisten Replikationsabschnitte (= "Replicon") sind etwas weniger als 30 μ lang; manche sind so kurz, daß sie bei der Autoradiographie kaum mehr zu erkennen sind. Die entgegengesetzte Richtung der Replikation, die übrigens in benachbarten Abschnitten zu unterschiedlicher Zeit einsetzen kann, wird so interpretiert, daß es spezielle Stellen auf einem DNS-Molekül gibt, von denen aus sich nach beiden Seiten hin Replikations - Y's bilden, die dem Molekül entlang wandern, bis sie sich mit entgegenkommenden Replikationspunkten treffen. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs beträgt im Mittel ca. 0,4 - 2,0 μ pro Minute, scheinbar auch ohne Unterschied zwischen hetero- und isopyknotischen Segmenten. Die in der frühen S-Phase replizierenden Abschnitte scheinen dies jedoch mit etwas größerer Geschwindigkeit zu tun als die spät-replizierenden Abschnitte (DÖRMER, SCHMOLKE, MUSCHALIK und BRINKMANN, 1970).

Schon frühere Untersuchungen von GANESAN und LEDERBERG (1965) zeigen an *Bacillus subtilis*, daß bei kurzer autoradiographischer Behandlung die Markierungspunkte stets in der Nähe der Zellmembran liegen (Hinweis bei COMINGS, 1968). Dasselbe konnten COMINGS und KAKEFUDA (1968) an synchronisierten menschlichen Zellen nachweisen, wie auch WILLIAMS und OCKEY (1970) an synchronisierten Fibroblastenkulturen vom chinesischen Hamster.

Auch die Ergebnisse biochemischer Untersuchungen an neu synthetisierter DNS von FRIEDMAN und MUELLER (1969) weisen in

diese Richtung. Neu synthetisierte DNS besitzt eine größere Dichte im CsCl-Gradienten, die auf eine Anheftung einer weiteren Zellkomponente zurückgeführt wird. Die Autoren konnten diesen Bestandteil als Lipopolysaccharid identifizieren und messen ihm eine bedeutende Rolle im Replikationsprozess zu.

Die Gesamtheit dieser Befunde veranlaßte COMINGS (1968) zu seiner These von der gesetzmäßigen Anordnung des Chromatins im Interphasekern. Demnach seien alle Chromosomen an bestimmten Punkten des DNS-Fadens an der Kernmembran befestigt. Die Haftpunkte entsprechen den Orten des Replikationsbeginns, die Länge der frei ins Kerninnere hängenden Chromosomenabschnitte entspricht einem Replicon. Weiterhin haben euchromatische Chromosomen längere freie Abschnitte, im Gegensatz zu heterochromatischen Bezirken mit kürzeren freien Abschnitten. Damit ergibt sich auch eine Erklärung für die periphere Lage der Chromozentren (PERA, 1969) : " die kürzeren und enger aneinanderliegenden freien Chromosomenabschnitte der heteropyknotischen Chromosomen imponieren im Lichtmikroskop als m.o.w. kompakte, der Kernmembran anliegende Chromozentren ".

Mit der unterschiedlichen Länge der frei flottierenden Chromosomensegmente könnte man auch die meist kürzere S-Phase heterochromatischer Abschnitte erklären. Jedoch auch für diese Tatsache schlägt COMINGS (1970 b) ein neues Denkmodell vor, indem er die bei den Untersuchungen an *Microtus agrestis* auftretende größere Markierungsdichte über heterochromatischen Abschnitten mit der größeren Replikationsuniformität der hier lokalisierten Replicone erklärt. Damit wird der Meinung LIMA DE FARIA's (1959) widersprochen, der denselben Befund an *Secale* mit der größeren DNS-Menge des Heterochromatins zu erklären sucht. COMINGS führte die größere Einheitlichkeit der Replikation auf den heterochromatischen Abschnitten außerdem darauf zurück, daß die Anheftpunkte der DNS in diesen Bereichen sehr dicht beieinander liegen. Mit der Ansicht COMINGS über die Einheitlichkeit der Replikation ist außerdem eine neue Interpretationsmöglichkeit der Befunde von DÖRMER, SCHMOLKE, MUSCHALIK und BRINKMANN (1970) sowie von LEDERER, BÜTTERICH MOORE und MITTERMAYER (1970) gegeben. Die von diesen Autoren

diskutierte größere Synthesegeschwindigkeit in der frühen S-Phase wird durch die zytophotometrisch gefundenen DNS-Werte pro Zeiteinheit belegt. Ein solcher Befund kann jedoch ebenso durch ein Replikationsverhalten im Sinne des COMINGS'schen Modells hervorgerufen werden.

VIII. DIE MITOSEAKTIVITÄT VON TUMOREN

Die schon seit BOVERI bekannten und von KOLLER (1960) (Hinweis bei LEUCHTENBERGER C. und R., 1966) in einer Übersicht beschriebenen Mitosestörungen bei Tumoren einerseits, sowie die in neuester Zeit gewonnenen Erkenntnisse über virusbedingte Tumoren andererseits - speziell die Interferenz der DNS-Viren mit dem Wirtsgenom -, lenkten in den letzten beiden Dezennien die Aufmerksamkeit der Tumorforschung auf den Kern als regulative Zentrale allgemein, und auf die DNS-Menge und Chromosomenzahl im Speziellen.

In diesem Zusammenhang sei insbesondere auf WALKER (1963) verwiesen, der in einer Studie den Zusammenhang zwischen dem Alterungsprozeß, der Differenzierung und der genetischen Kontrolle aufzeigt. Der Kern ist demnach keine totipotente, stabile Struktur, sondern sich von Teilung zu Teilung immer stärker, irreversibel differenzierend. Der Zellteilung kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, da sie nämlich in direkter Beziehung zur Differenzierung steht. Diese folgt, wie mikrokinematographische Studien an hämatopoetischem Gewebe zeigen, direkt auf die Mitose und ist dadurch von ihr abhängig.

Auch für den speziellen Fall einer "Differenzierung", nämlich der Tumorentstehung werden von WALKER (1963) Beziehungen zur Teilungsaktivität aufgezeigt, so die Tatsache, daß die Tumorfrequenz durch UV-Bestrahlung zunimmt, oder die Erfahrung, daß eine gute Korrelation zwischen Mitoserate und Spontanumorfrequenz in Wechselgeweben besteht. Dies weist darauf hin, daß die Wahrscheinlichkeit für eine neoplastische Mutation mit der Häufigkeit wächst, mit der das genetisch instabile Stadium der Mitose durchlaufen wird.

Andererseits kann auch erwartet werden, daß eine Änderung der Differenzierungsrichtung in direkter Abhängigkeit zur Mitose und somit ganz generell zum Generationszyklus steht und daß dies ein allgemeines Prinzip ist, das für jede Art von Differenzierung als Denkmodell dienen kann und somit auch für den speziellen Fall der Onkogenese.

In einer umfassenden Studie gibt HEMPEL (1968) einen Überblick über die Generationszeiten von zwanzig verschiedenen Tumoren. Diese schwankt zwischen 11,5 Stunden bei der lymphatischen Leukämie der Maus und ca. 2,8 Tage beim B 16-Melanom der Maus. HEMPEL zieht den Schluß, daß bei Tumorzellen die Generationszeiten in viel engeren Grenzen variieren als bei normalen Zellen und etwa in der gleichen Größenordnung liegen wie in normalen, schnell wachsenden Geweben. Die zwischen den einzelnen Tumoren gefundenen Unterschiede in der Länge des Generationszyklus beruhen - genau wie bei normalen Zellen - in erster Linie auf Unterschieden in der G_1 -Phase, während die Summe $G_2 + M + S$ sehr viel weniger schwankt (siehe auch LEDERER und LEMNARTZ, 1968).

Natürlich ist die rasche Wachstumsgeschwindigkeit nicht mit Malignität gleichzusetzen. Bei normaler Darmschleimhaut beispielsweise liegt die Einbaurate von 3H - Thymidin und damit auch die Proliferationsgeschwindigkeit sehr viel höher als bei bösartigen Geschwülsten. So befinden sich nach EDER (1966) 35 - 42% der die Regenerationspopulation darstellenden Darmzellen in der S-Phase. Solche schnellwachsende Normalgewebe verfügen aber durch gleichzeitiges Abschilfern von Zellen über ein "steady state", das den Tumoren verlorengegangen ist. MENDELSCHN (Hinweis bei HEMPEL, 1968) detailliert die Proliferationskinetik eines Tumors in eine sog. "Growth - Fraction" und eine "Non Growth - Fraction". Erstere rekrutiert sich aus einem Teil der vitalen Zellen des Tumorrandes. Von den durch Zellteilung gebildeten Zellen teilt sich nur ein bestimmter Bruchteil erneut. Die restlichen Tochterzellen treten dagegen aus exogenen oder endogenen Ursachen nicht mehr in die Mitose ein. Dieser Teil wird somit Bestandteil der "Non Growth - Fraction".

Unter diesen Aspekten ist es eigentlich selbstverständlich, daß das Gesamt-DNS-Verteilungsmuster eines Tumors unterschiedlich zu einem Gewebe im sog. steady state ist. Allein auch vom optischen Eindruck her, auf Grund der Kerngrößenzunahme und der intensiveren Anfärbbarkeit, wird bereits ein erhöhter DNS-Gehalt zu erwarten sein.

IX. PHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG VON TUMORZELLKERNEN

- BESTIMMUNG DES GESAMT-DNS-GEHALTES -

Die ersten Mitteilungen hierüber stammen von CASPERSSON und SANTESSON (1942) (Hinweis bei LEUCHTENBERGER C. und R., 1966). Mit Hilfe der von CASPERSSON entwickelten Methode der Ultraviolettmikrospektrophotometrie wurden verschiedene Karzinome untersucht. Trotzdem es damals noch nicht möglich war, den absoluten Gehalt an Nukleinsäuren zu bestimmen, konnte immerhin eine deutliche relative Erhöhung desselben in peripheren, gut vaskularisierten Tumorteilchen festgestellt werden. Aus den folgenden Jahren stammen nur wenige, dieses Problem behandelnde Veröffentlichungen (z.B. LEUCHTENBERGER C., KLEIN und KLEIN, 1952). Erst 1954 wurden von LEUCHTENBERGER C. und R. sowie DAVIS diesbezügliche Untersuchungen in größerem Umfang durchgeführt. An Hand von Proben aus 49 normalen und 27 neoplastisch entarteten Geweben wurden 2500 Zellen untersucht und von den Autoren festgestellt, daß bei den Tumoren im Gegensatz zu den normalen Zellen nicht nur der mittlere DNS-Gehalt stark schwankt, sondern ebenso eine starke Variabilität von Zelle zu Zelle verzeichnet werden kann. Es wird jedoch auch darauf hingewiesen, daß hierin kein Charakteristikum der Malignität zu erblicken ist, sondern nur der gesteigerten Proliferationskinetik zuzuschreiben ist.

Auch weitere von SANDRITTER an menschlichen Tumoren erhobene Befunde lassen sich in dieser Weise interpretieren. SANDRITTER (1961) beschreibt in Übereinstimmung mit den Befunden von LEUCHTENBERGER C., LEUCHTENBERGER R. und DAVIS (1954) und denen von ATKIN und RICHARDS (1956) vorwiegend einen DNS-Gehalt verschiedener Tumoren des Menschen, der hauptsächlich zwischen diploid und tetraploid liegt. Aber auch hypodiploide Werte bei einem kleinzelligen Bronchialkarzinom, sowie rein diploide oder rein tetraploide Tumoren sind beschrieben worden (SANDRITTER, 1961). LAMPERT (1968) findet bei lymphatischen Leukämien des Menschen einen DNS-Gehalt, der zwischen diploid und tetraploid schwankt, dagegen bei myeloischen Leu-

Wählen des Menschen eine deutliche Gruppierung des DNS-Gehaltes um den diploiden Basiswert. Auf die Bedeutung dieser Befunde sei an späterer Stelle eingegangen.

X. DER KARYOTYPUS VON TUMORZELLEN

Die Bestimmung von Chromosomenzahl und -struktur (maligner) Tumorzellen ist besonders an Tumoren in der Ascitesform und an Leukämien durchgeführt worden. Überblickt man die Literatur über Chromosomenuntersuchungen bei Leukosen des Menschen und der Tiere, so ist in der Mehrzahl der malignen Zellen eine numerische und/oder strukturelle Abweichung der Chromosomen festzustellen (PORTER, BENEDICT, BROWN und PAUL, 1969).

SANDBERG, ISHIHARA, MIWA und HAUSCHKA (1961) berichten bei der akuten lymphoblastischen Leukämie des Menschen von aneuploiden, insbesondere von hyperdiploiden Karyogrammen. LAMPERT (1968) weist in einer ausführlichen Studie über lymphatische Leukämien das Vorliegen aneuploider Chromosomensätze nach, wobei die zusätzlichen Chromosomen unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden können.

Auch bei den Leukosen der Haustiere zeigen sich keine konstanten Chromosomenanomalien. BASRUR, GILMAN und McSHERRY (1964) beschreiben bei einer Färse mit "akutem Lymphosarkom" ein zusätzliches Chromosom, das Ähnlichkeit mit dem X-Chromosom zeigt. HARE, McFEELY, ABT und FEIERMAN (1964) finden bei leukosekranken Rindern sowohl hypo- als auch hyperdiploide Chromosomensätze. Bei zwei Rindern konnten zwei zusätzliche metazentrische und akrozentrische Chromosomen gefunden werden. Ein abweichender Karyotyp konnte in 4 der 17 untersuchten Rinder nur in Lymphknotenzellen, jedoch nicht in den Lymphozyten des Blutes nachgewiesen werden. HARE, YANG und McFEELY (1967) finden unter 47 Fällen von Rinderleukose in der Mehrzahl der Chromosomenpräparationen (33 Fälle) einen hyperdiploiden bis nahezu tetraploiden Karyotyp. 5 Fälle waren diploid (oder pseudodiploid), ein weiterer hypodiploid. BAYREUTHER (1960) berichtet von normalen Chromosomenkonstitutionen bei Spontantumoren, beispielsweise bei einer lymphatischen Rinderleukose sowie bei verschiedenen menschlichen Leukämien.

Die von der Norm abweichenden Chromosomenzahlen neoplastischer Zellpopulationen sind nicht uniform, sondern schwanken um einen Mittelwert. Letzterer wird nach MAKINO und KANO (1953) als s-Zahl (stemline number) bezeichnet und entspricht oft nicht der diploiden Chromosomenzahl der betreffenden Tiergattung. Die numerische Variation eines Tumors entsteht durch Verlust oder Gewinn einzelner Chromosomen (aneuploide Variation) oder durch Vervielfachung, seltener auch durch Verlust ganzer Genome (polyploide Variation) (LEVAN und HAUSCHKA, 1953). Die s-Zahlen variieren bei den meisten Tumoren von hypodiploid bis hypertetraploid.

Chromosomen - morphologisch können sich Tumoren in zweierlei Hinsicht vom normalen Genom unterscheiden. Hauptsächlich bei den numerischen Aberrationen kann es zum Auftreten leicht erkennbarer, neuer Chromosomentypen kommen, welche den Namen Marker-Chromosomen tragen. Als Beispiel für eine solche Anomalie sei hier das Philadelphia-Chromosom erwähnt, das aus dem Autosom G 21 entsteht, indem durch eine interkalare Deletion ein Teil des langen Armes verloren geht. Es wird mit wenigen Ausnahmen nur bei der chronisch-myeloischen Leukämie des Menschen gefunden (ca. 88% aller Fälle) und stellt bis heute die einzige spezifische Chromosomenanomalie bei einer proliferativ-neoplastischen Erkrankung des Menschen dar. Es kommt ausschließlich in den Zellen der Granulo-, Erythro- und Megakaryopoese vor, nicht hingegen in Lymphozyten und Fibroblasten (MERKER, 1971).

Die zweite Möglichkeit einer Chromosomenveränderung in Tumorzellen besteht darin, daß die scheinbar normalen Chromosomen, feine, nur durch genaue quantitative Untersuchungen nachweisbare kryptostrukturelle Veränderungen aufweisen. Dabei wären vor allem Abweichungen in der relativen Länge und im Armindex zu erwähnen (RUTISHAUSER, 1963; PORTER, BENEDICT, BROWN und PAUL, 1969).

XI. BESTEHT BEI TUMOREN EIN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN
CHROMOSOMENZAHL UND DNS - GEHALT ?

Während SANDRITTER (1961), ATKIN (1962), ATKIN, MATTINSON, BAKER (1966), HÄMMERLI, FJELDE, ZWEIDLER und STRÄULI (1966), sowie LAMPERT (1968) bis auf geringe Ausnahmen eine m.o.w. strenge positive Korrelation zwischen Anzahl der Chromosomen und dem Gesamt-DNS-Gehalt bejahen, sprechen die Befunde von RICHARDS und ATKIN (1960), FILKUKA und SCHLÜTER (1966), sowie FILKUKA, ADAMEK und LEDERER (1968) zumindest zum Teil dagegen. Die letztgenannten Autoren beschreiben dies ausführlich am Beispiel eines rundzelligen Mäusekarzinoms, bei dem der mittlere DNS-Gehalt ca. 20% höher liegt, als es die Anzahl der Chromosomen erwarten läßt. Methodische Fehler scheiden hier aus, wie z.B. unterschiedliche Hydrolyseeigenschaft zwischen normalen Zellen und Tumorzellen oder eine Beeinflussung der Anfärbung durch Kernproteine (ATKIN, BECAK und OHNO, 1965), (Näheres zur Methode siehe später!). Der Grad solcher Abweichungen erreicht niemals 20%, wie vergleichende Färbungen ohne Hydrolyse beweisen. Die von HAUSCHKA (1963) aufgezeigte Fehlermöglichkeit, nämlich die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit aneuploider Zellen (Klonbildung!) und die daraus resultierende Abweichung des mittl. DNS-wertes vom Modalwert der Chromosomenzahl, trifft für den von FILKUKA beschriebenen Fall nicht zu; die Zahl der aneuploiden Zellen war in diesem Versuchsobjekt äusserst gering. Somit kann diese Diskrepanz nur mit einem abweichenden DNS-Gehalt aller oder auch nur einiger Tumorzellchromosomen im Sinne einer Endopolyploidisierung erklärt werden. Daß in der Tat einzelne Chromosomen besonders bei der Kanzerisierung betroffen sein können, ist auch schon rein morphologisch an den unterschiedlichen Karyogrammen zu erkennen, die von GHOSH und GHOSH (1970) an Hela-Stämmen beschrieben werden.

XII. DER BEGRIFF " TUMOR-STAMMLINIE " UND SEINE

DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG

Bei der Aufstellung der Gesamt-DNS-Verteilungsmuster von Tumoren ergeben sich, genau wie bei allen proliferierenden Geweben, Häufigkeitsgipfel der DNS-Verteilung, die einem bestimmten Ploidiegrad entsprechen. Dabei wird der erste Häufigkeitsgipfel, welcher die Zellen der G_1 -Phase repräsentiert, als Stammlinie bezeichnet (SEIDEL und SANDRITTER, 1963). Wie an früherer Stelle erörtert, entspricht dieser DNS-Wert bei normalem Gewebe der diploiden Chromosomenzahl ($2n$). Bei Tumoren gilt diese Abhängigkeit jedoch nicht in allen Fällen, wie die vorangehenden Erläuterungen zeigten. Dabei ist auch zu berücksichtigen, daß nach den Untersuchungen von FORD, JACOBS und LAJTHA (1958) sowie von SANDBERG, ISHIHARA, MIWA und HAUSCHKA (1961) am Knochenmark der Menschen gezeigt wird, daß schon normalerweise Zellen mit aneuploidem Chromosomensatz (bis ca. 10%) vorkommen. Untersuchungen von WAKONIG und STICH (1960) an verschiedenen Geweben der Maus, sowie von TANAKA (1958) am Knochenmark der Ratte, bestätigen das normalerweise Auftreten einer aneuploiden Zellpopulation (Hinweis bei RUTISHAUSER, 1963).

Es bleibt weiterhin fragwürdig, ob bei Zellkulturen menschlicher und tierischer Leukämien auch tatsächlich die malignen Zellen bei der Metaphasepräparation erfasst werden oder ob nicht auf Grund unterschiedlichen FHA-Stimulierungsvermögens eine Selektion normaler Zellen erfolgt (GROPP und KLEE, 1969).

Aus diesen Gründen sollte darauf verzichtet werden, den Begriff der Stammlinie - gemäß einem Vorschlag von MAKINO und KANO (1953) - auf den Modalwert der Chromosomenzahl zu beziehen. Da sich ja letztlich mit dem Begriff der Stammlinie eine Charakterisierung des betreffenden Gewebes verbinden soll, muß dieser eine unmißverständliche Aussagekraft besitzen. Dies scheint zumindest beim Begriff der Chromosomenstammlinie nicht der Fall zu sein, da GHOSH und GHOSH (1970) das Wachstumsverhalten einzelner Bela-Stämme in erster Linie auf die individuellen Unterschiede der Karyogramme zurückführen und

betonen, daß Zellen trotz identischer Chromosomenzahl in ihrem feinstrukturellen Karyotyp weiten Schwankungen unterworfen sein können. Wesentlich eindeutiger hingegen ist der Wert der DNS-Ploidiestufe zu interpretieren; ist dies jedoch ausreichend, um einen Tumor damit zu charakterisieren?

Die Ploidiestufe ist ein objektives Zeichen dafür, in welchem Grade sich der DNS-Gehalt eines Tumors von dem des normalen Gewebes unterscheidet. Dies läßt sich am Wandern der Stammlinie aus dem euploiden Bereich erkennen. Die Stammlinie ist offenbar für jeden Tumor individuell verschieden, meist innerhalb dieser Tumorphpopulation relativ konstant (RUTLAND, 1963) und somit das Kennzeichen der den Tumor charakterisierenden Zellpopulation. Bis zur Stabilität der Stammlinie durchläuft ein Tumor aber wahrscheinlich eine Periode des genetischen Ungleichgewichts (EICKH, EMMINGER, STRAUSS, MOHR und WREA, 1965) mit einem hohen Prozentsatz polyploider Zellen. Leider ist, zumindest aus der einmaligen DNS-Analyse, kaum zu erkennen, ob der Tumor schon eine stabile Stammlinie ausgebildet hat. Weil aber nur eine tumorcharakteristische Stammlinie zu bestimmten klinischen Eigenschaften in Beziehung gesetzt werden kann, sind einmalige Untersuchungen nur mit Einschränkung zu bewerten. So können auch die Unterschiede in den Befunden einzelner Untersucher erklärt werden. Teilweise wurde nämlich ein Zusammenhang zwischen klinischen Eigenschaften einer Geschwulst und der Lage ihrer Stammlinie im aneuploiden Bereich abgelehnt (ISHIHARA, KIKUCHI und SANDBERG, 1963; EICKH, EMMINGER, STRAUSS, MOHR und WREA, 1965), teilweise eine solche Beziehung bestätigt (EHLERS, 1966).

Trotzdem können nicht alle widersprüchlichen Berichte auf methodische Fehler zurückgeführt werden. So konnten SEIDEL und SANDRITTER (1963) an einer malignen Lungenadenomatose, sowie SANDRITTER (1964 a) am Beispiel des Carcinoma in situ überzeugend zeigen, daß auch eine aneuploide DNS-Stammlinie keine unbedingt notwendige Voraussetzung für ein invasives Wachstum darstellt. Beim Carcinoma in situ können intraepithelial sich entwickelnde, nicht invasive Zellpopulationen

schon eine aneuploide DNS-Stammlinie aufweisen, bei der endgültigen Realisation der Malignität bleibt diese Stammlinie erhalten.

Andererseits können auch in malignen, metastasierenden Tumoren Zellen mit einem normalen, diploiden DNS-Gehalt bzw. Chromosomensatz gefunden werden (BAYREUTHER, 1960; SANDRITTER, 1961). Dies wird von SANDRITTER, HILWIG, ENGELBARTH, KIEFER G. und KIEFLER R. (1965 a), durch Studien an Zellkulturen bestätigt, da auch Zellen mit einem diploiden Chromosomensatz bzw. DNS-Gehalt aus der Kultur auf Versuchstiere übertragen werden konnten und dort Tumoren hervorriefen. SANDRITTER (1966), sowie SANDRITTER, CARL und RITTER (1966) faßten diese Ergebnisse zu folgender Aussage zusammen : maligne Tumoren besitzen eine breitere Streuung ihrer DNS-Werte als benigne Tumoren, d.h. also, eine aneuploide Stammlinie kann als Erkennungsmerkmal für einen Tumor dienen. Eine reguläre DNS-Verteilung schließt jedoch nicht das Vorliegen eines malignen Tumors aus.

Ein weiterer prinzipieller Vorbehalt ist gegen den Versuch vorzubringen, aus der Ploidiestufe auf den Malignitätsgrad eines Tumors zu schließen. Die Malignität einer Geschwulst wird einerseits von den Eigenschaften der Geschwulst selbst (Wachstumsgeschwindigkeit, Zerstörungskraft, Metastasierungseigung, Haftfähigkeit der einzelnen Tumorzelle), andererseits aber auch von den Gegebenheiten im Wirtsorganismus (allgemeine Reaktionslage, immunologischer Status, Art des dem Tumor benachbarten Gewebes) bestimmt. Es ist deshalb von vorneherein problematisch, den klinischen Malignitätsgrad einer Tumorerkrankung allein aus Parametern zu bestimmen, die lediglich den Tumor selbst berücksichtigen. Trotz dieser Vorbehalte erweist sich das Kriterium der Stammlinie gerade in den Fällen als wertvoll, wo Mitosestadien kaum vorhanden sind oder ganz fehlen und die deshalb in der Diagnostik als Grenzfälle gelten. Hierzu zählen insbesondere Tumoren mit Malignitätsverdacht. Weiterhin gibt es Fälle, in denen nur die DNS-Bestimmung eine Unterscheidung in maligne und benigne Tumoren eines bestimmten Organs erlaubt. So konnten PERSKY und LEUCH-

TENBERGER (Hinweis bei LEUCHTENBERGER C. und R., 1966) trotz gleichen histologischen Bildes maligne von benignen Prostatatumoren exakt auf Grund des deutlich verschiedenen DNS-Gehaltes unterscheiden. Ähnliche diagnostische Möglichkeiten wurden auch von STICH, FLORIAN und EMSCN (1960) an Rektumtumoren ausgeschöpft.

XIII. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON TUMORZELLEN

Die Morphologie einer malignen Zelle ist u.a. dadurch gekennzeichnet, daß die dichten, scholligen Kernstrukturen gegenüber einem vergleichbaren Normalgewebe besonders ins Auge fallen. Dieser, auch an malignen Zellkulturen zu erhebende Befund der gesteigerten Heteropyknose von Tumorzellen (SANDRITTER, HILWIG, ENGELBARTH, KLEPER G. und KIEFER R., 1965 a) konnte durch biochemische Untersuchungen bestätigt werden. Die durch Kernfraktionierung gewonnene DNS konnte durch ihr unterschiedliches Bindevermögen für (markiertes) Actinomycin C in Eu- und Heterochromatin unterteilt und mengenmäßig bestimmt werden. Die mit dem Euchromatin identifizierbare Fraktion bindet etwa sechsmal mehr Actinomycin als die Heterochromatinfraktion (HARBERS, LEDERER, SANDRITTER, SPAAR, 1968 a). Bei diesen Untersuchungen wurde an Rattenlebern nach kontinuierlicher Verabfolgung von Diäthylnitrosamin und N-Nitrosomorpholin und der dabei erzielten Kanzerisierung eine Zunahme der Heterochromatinfraktion verzeichnet, die von 22% der normalen Rattenleber in 40 Tagen auf etwa 40% anstieg. In entsprechendem Maße nahm die Euchromatinfraktion ab. Histologisch zeichneten sich die kanzerisierten Leberzellen durch eine Vergrößerung der Kernstruktur aus. Eine außerdem durchgeführte histochemische Gesamt-DNS-bestimmung (Feulgen-Zytophotometrie) wies jedoch auch nach 180-tägiger Versuchsdauer auf keine Änderung des Gesamt-DNS-Gehaltes hin. HARBERS und SANDRITTER (1968 b) sehen in der Tatsache der gesteigerten Heterochromatisierung und der daraus zu schließenden verminderten Verfügbarkeit von genetischer Information ein bedeutendes pathogenetisches Prinzip. Je nach den Chromosomenstellen, die von der Heterochromatisierung betroffen sind, soll es entweder zu einem letalen Funktionsverlust oder zu gestörter Teilungsaktivität kommen.

Die von HARBERS, LEDERER, SANDRITTER und SPAAR (1968a) angewendete biochemische Methode wird sich nicht nur wegen ihres großen Aufwandes nicht bewähren, sondern auch deshalb, da eine wünschenswerte Zuordnung zu einzelnen Zellstrukturen

nicht möglich ist. Bei der Lösung von Problemstellungen, wo letzterer Aspekt besondere Bedeutung besitzt, nehmen daher Methoden, welche die zytologische oder histologische Architektur nicht zerstören, eine bevorzugte Stellung ein. Außer der Mikroskopinterferometrie kommt hierbei hauptsächlich die Mikroskopphotometrie in Betracht (Übersicht bei SCHIEMER, 1967). Seit der Entwicklung der letztgenannten Methode durch CASPERSSON in den Jahren 1936-1942 wurde sie laufend verfeinert, um außer qualitative, insbesondere auch quantitative Aussagen zu erlauben (Übersicht bei SANDRITTER, 1958). Zum ersten Mal konnte das Bild einer einzelnen Zelle in situ unter dem Mikroskop gleichzeitig mit ihrer chemischen Zusammensetzung verglichen und Substanzmengen bis zu einbillionstel Gramm (10^{-12} g) erfasst und einzelnen Zellstrukturen zugeordnet werden. Im Folgenden soll daher das physikalische und - soweit erforderlich - auch das technische Prinzip der Mikrospektrophotometrie erläutert werden.

XIV. DIE MIKROSPAKTROPHOTOMETRIE

(14.1) Physikalische Grundlagen

Das Licht einer Lichtquelle, die ein kontinuierliches Spektrum aussendet - z.B. eine Bogenlampe - wird beim Durchgang durch einen Stoff in einer für diesen charakteristischen Weise verändert. In dem kontinuierlichen Spektrum erscheinen dunkle Linien oder Streifen bei bestimmten Wellenlängen, die absorbiert, d.h. nicht durchgelassen werden. Ein solches Spektrum heißt das Absorptionsspektrum des betreffenden Stoffes. Ein Gerät zur Beobachtung des Spektrums nennt man ein Spektrometer oder ein Spektroskop. Die Tatsache der strengen, spezifischen Zuordnung eines Spektralbildes zu einem bestimmten Stoff wird zur Erkennung desselben ausgenützt, insbesondere wenn er in kleinster Menge in einem Gemisch bzw. einer Lösung vorliegt. Dieser Anwendungsbereich wurde zum einen von der analytischen Chemie, zum anderen von der Zytologie erschlossen.

Das gewünschte Spektralbild beschränkt sich keineswegs auf den sichtbaren Wellenlängenbereich. Oft wird jenseits dieses Bereichs gearbeitet, speziell bei den hier interessierenden biologischen Objekten. Dadurch wird verständlich, daß auch von der Optik her völlig unterschiedliche Versuchsanordnungen nötig sind.

Im einfachsten Fall kann das Spektrum auf einer, für diesen Bereich empfindlichen, photographischen Platte festgehalten werden; diese Möglichkeit entspricht somit der Projektion des sichtbaren Spektrums beispielsweise auf einen Wandschirm etc.. Eine weitaus schneller arbeitende Methode bietet sich durch die Möglichkeit, die elektromagnetischen Wellen der einzelnen Spektralbereiche in elektrische Impulse umzusetzen. Dies geschieht mit Hilfe einer Photozelle, an deren Galvanometer ein entsprechender Ausschlag registriert wird. Da der primäre Strom zu schwach ist, um am Meßinstrument zu einer Anzeige zu führen, wird er noch durch einen sog. Sekundärelektronenvervielfacher in proportionalem Maße verstärkt.

Sofern die Photozelle für eine bestimmte Lichtstärke geeicht ist, kann die Galvanometeranzeige als direktes Maß für die Lichtintensität gewertet werden. Dadurch ist die Voraussetzung für eine quantitative Auswertung gegeben, da das Linienbild des Spektrums gleichsam übersetzt wird in eine Lichtintensitätsverteilungskurve. Auf der Abszisse wird die Wellenlänge, auf der Ordinate die Lichtintensität aufgetragen. Die Kurvenbereiche mit der geringsten Lichtintensität entsprechen dabei den Spektralbereichen mit der höchsten Absorption.

Es gelten folgende Gesetzmäßigkeiten bei der physikalischen Wechselwirkung zwischen Licht und Materie:

a) die Absorption (A)

sie stellt den auf die Intensität des in das Medium einfallenden Lichtes bezogenen Lichtverlust durch das Medium dar

$$A = \frac{I_0 - I_1}{I_0} = 1 - \frac{I_1}{I_0}$$

I_0 = ins Medium eindringender Lichtstrom

I_1 = ausfallender Lichtstrom

b) T = Durchlässigkeit = $\frac{I_1}{I_0}$

Es gilt somit: $A = 1 - T$

c) Die Abhängigkeit von I_1 und I_0 , nach dem Durchdringen eines absorbierenden Mediums der Dicke d, stellt sich durch eine logarithmische Funktion dar:

$$I_1 = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}$$

wobei ϵ eine Stoffkonstante darstellt (diejenige Absorption, die ein bestimmter Stoff bei einer gewissen Wellenlänge erzielt).

c = Konzentration des absorbierenden Mediums .

Umgeformt:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I_1} = \log_{10} \frac{1}{T} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Dieser Zusammenhang zwischen einfallender und ausfallender Lichtintensität, Konzentration der absorbierenden Substanz und deren Dicke wird als LAMBERT - BEER'sches Gesetz bezeichnet. Der Einfachheit halber setzt man für den Quotienten

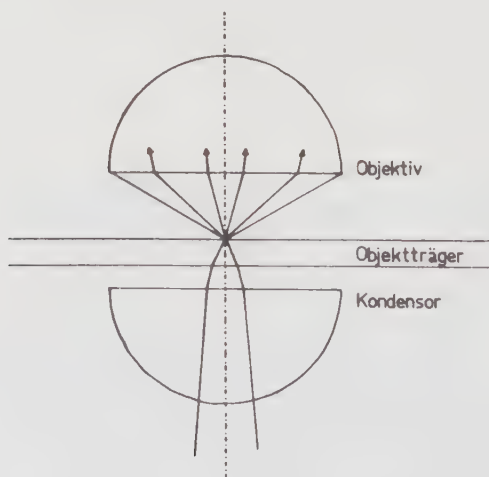
$$\log \frac{I_0}{I_1}$$

den Ausdruck $E = \text{Extinktion}$

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Die Extinktion ist der Schichtdicke, sowie der Stoffkonzentration proportional. Löst man diese Gleichung nach c auf, so kann man bei bekannter Schichtdicke (d) und bekanntem molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) aus der gemessenen Extinktion (E) die Konzentration (c) der gesuchten Substanz messen. Das LAMBERT - BEER'sche Gesetz ist somit die Grundlage für quantitative Aussagen, die an Bedeutung bei weitem über den qualitativen Aspekten stehen.

In der folgenden Abbildung ist das Prinzip des Absorptionsvorgangs dargestellt:



(14.2) Problematik der Anwendung der Spektrophotometrie auf das histologische Präparat

(14.2 a) Objektinhomogenität und Schnittdickenunterschiede

Wendet man die oben aufgezeigten Möglichkeiten beispielsweise für Untersuchungen der analytischen Chemie an, so befindet sich hier das absorbierende Medium in einer Küvette mit konst. Schichtdicke d . In dieser Hinsicht besteht jedoch ein wesentlicher Unterschied zu Untersuchungen im mikroskopischen Bereich, da im letzteren Fall die Dicke des Objekts meist nicht bekannt ist. Außerdem besteht noch - insbesondere an Zellen - eine starke Inkonzanz der Schichtdicke über das gesamte Objekt hinweg. Dies bedeutet, daß bei allen mikroskopischen Anwendungen ein weiterer unbekannter Faktor im LAMBERT-BEER'schen Gesetz auftritt. Diese Schwierigkeit einer Gleichung mit zwei Unbekannten wird umgangen, indem man anstelle der Konzentration einer Substanz, d.h. das Verhältnis zwischen Masse und Volumen, die sog. Flächenbelegung in das LAMBERT-BEER'sche Gesetz einführt (HERRMANN, 1967). Multipliziert man nämlich beide Seiten der Gleichung

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

mit einem Flächenelement

$$E \cdot \Delta f = \epsilon \cdot c \cdot d \cdot \Delta f$$

so besitzt das Produkt $c \cdot d \cdot \Delta f$ die Dimension einer Masse, so daß gleichbedeutend geschrieben werden kann:

$$E \cdot \Delta f = \epsilon \cdot \Delta M$$

Durch Integrieren dieser Gleichung über die Gesamtfläche der Zelle erhält man die Summe aller Massenelemente ΔM und somit die Gesamtmasse M der Zelle, die an der betreffenden Stelle des Spektrums ihr Absorptionsmaximum besitzt.

Daraus ergibt sich die Schlußfolgerung, daß nur die Summe vieler kleiner Flächenelemente zu einer möglichst genauen Aussage führen. Eine Integration über die gesamte Zelle würde inhomogene Strukturen zu einer Einheit zusammenfassen und somit zu einem völlig falschen Gesamtwert der Masse führen. Die Größe des einzelnen Flächenelementes ist natürlich mit dem Durchmesser des verwendeten Lichtbündels identisch. Dieses muß einerseits so klein sein, daß innerhalb des ausgeleuchteten Feldes keine wesentlichen Inhomogenitäten des Materials, sowie auch keine wesentlichen Unterschiede der Dicke vorkommen. Andererseits muß aber das Lichtbündel so groß sein, daß die Auflösungsgrenze des Mikroskops nicht unterschritten wird und auch die Lichtintensität noch im zuverlässig meßbaren Bereich liegt. Beide Bedingungen sind meist dann optimal erfüllt, wenn eine Meßfeldblende von ca. $0,5 \mu$ gewählt wird.

Beim Meßvorgang ist also so vorzugehen, daß Flächenelement für Flächenelement nacheinander auszuleuchten ist und die dabei erzielten Teiltextinktionen summiert und mit den durchwanderten Flächen multipliziert werden. Durch die Division dieses Produkts mit dem stoffspezifischen Koeffizienten ergibt sich die Masse des gesuchten Stoffes in der Größenordnung von einigen Picogramm (10^{-12} g).

Es gibt prinzipiell zwei Methoden, um das Nacheinander - Messen der einzelnen Flächenelemente eines mikroskopischen Objekts zu bewerkstelligen:

- 1.) Bei unbeweglichem Objekt wird das Strahlenbündel bewegt (flying spot) und rastert das Objekt z.B. mit Hilfe des wandernden Lichtpunktes einer Fernsehröhre ab (FREED und ENGLE, 1962).
- 2.) Bei unbeweglichem Meßstrahl wird das mikroskopische Objekt nach einem der folgenden Rasterverfahren bewegt:

- a) Punktmessungen, die an beliebig vielen Stellen des Objektes ausgeführt werden
= "multiple plug"
- b) Punktmessungen, die systematisch in benachbarter Reihenfolge gesetzt werden
- c) mäanderförmige, kontinuierliche Messung durch zeilenweises Abfahren des Präparates (SCANNING-Verfahren, z.B. UMSP 1 von Zeiss; Integrating Microdensitometer, BARR and STROUD)
- d) Messung mit Hilfe einer kontinuierlich rotierenden Scheibe, die spiralförmig gefenstert ist (Nipkow-Scheibe). Das Scannen erfolgt wie bei c, jedoch nicht in geraden Linien, sondern kreisbogenförmig; alle Zeilen werden nur in einer Richtung durchlaufen (z.B. CYDAC von Airborne Instruments, Literatur siehe MAYALL und MENDELSON, 1970).

Die unter 2 aufgezählten Verfahren erzielen im allgemeinen eine größere Meßgenauigkeit, da die Ausleuchtung des Gesichtsfeldes auf Grund der Unbeweglichkeit des Meßstrahls für das gesamte Objekt stets dieselbe bleibt. Im anderen Fall würde die zwangsläufige Unzulänglichkeit jeder Optik stets Schwankungen des Durchlässigkeitsgrades vortäuschen.

(14.2 b) Reflexion, Brechung, Streuung und Beugung des Lichtes

Prinzipiell spielen sich fünf physikalische Vorgänge am durchstrahlten Objekt ab, von denen jedoch nur einer, nämlich die Absorption erwünscht ist. Die anderen vier Möglichkeiten der Wechselwirkung zwischen Objekt und elektromagnetischer Strahlung, nämlich

die Reflexion

die Streuung

die Brechung

und

die Beugung

gelten als Störfaktoren, selbst wenn sie bei der Auswertung der Ergebnisse zumindest teilweise auf mathematischem Weg zu eliminieren sind. Insbesondere die Partikel, die zufällig oberhalb oder unterhalb des gesuchten Objektes liegen, führen generell zur Ablenkung der Strahlung. Dies kann sowohl Pseudo-Absorptionen vortäuschen, weil Strahlung in der Meßrichtung verloren geht, als auch durch von den Randpartien her einfallender Strahlung zu einer scheinbaren Absorptionsminderung führen (SANDRITTER, 1958).

Die Reflexion und die Streuung hängen in erster Linie von der Wellenlänge des einfallenden Lichtes ab, sind also durch die Apparatur primär nicht zu beeinflussen. Je kleiner die Wellenlänge, um so größer ist die Streuung. Es erhebt sich also unter diesem Aspekt die Forderung nach möglichst langwelliger Durchstrahlung, eine Notwendigkeit, die zu einer anderen, sehr wichtigen Überlegung in völligem Gegensatz steht: zum Wunsch nach möglichst großem Auflösungsvermögen, das bekanntlich gerade mit kleiner werdender Wellenlänge zunimmt. Bei den gebräuchlichen optischen Instrumenten wird zwischen diesen beiden Überlegungen dadurch ein Kompromiß geschlossen, indem man bei relativ kurzwelligem Licht arbeitet und das dadurch entstehende Streulicht durch eine möglichst große numerische Apertur des Objektivs einfängt. Eine gleichwertige kleine numerische Apertur des Kondensors (0,2-0,3) trägt außerdem noch zur Verminderung des Streulichtanteils bei. Das Verhältnis zwischen Kondensor- und Objektivapertur soll etwa 1 : 3 betragen; bei dieser Relation sind Beugungs- und Interferenzerscheinungen an der Optik auf ein Minimum beschränkt.

Die Brechung kommt durch die Beschaffenheit des Objektes zustande, d.h. durch die Anwesenheit von Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex im Strahlengang. An den Grenzflächen zwischen zwei solchen Medien kommt

es dann zu einer bemerkenswerten Ablenkung des Lichtes. Nachdem in dieser Hinsicht das biologische Objekt keiner Korrektur unterzogen werden kann, gewisse Brechungen also hingenommen werden müssen, bleibt nur die Ausschaltung des hauptsächlichsten Störfaktors in unserer Hand, nämlich die Wahl eines dem biologischen Objekt angepassten Eindeckmediums mit einem Index ⁿ Objekt von 1,55 - 1,56.

ⁿ Medium

Das Phänomen der Beugung ist hauptsächlich an das optische System gebunden. Tritt Licht durch enge Öffnungen, welche in ihrer Breite die Größenordnung der Lichtwellenlänge wesentlich unterschreiten, so treten deutliche Beugungserscheinungen auf. Nach dem HUYGENS'-schen Prinzip wirkt der Spalt wie eine Lichtquelle, von der aus sich Licht jenseits des Spaltes nach allen Richtungen ausbreitet, jedoch nicht mit gleichbleibender Intensität. Durch Interferenzerscheinungen in bestimmten Bereichen kommt es zu einer alternierenden Helligkeitsverteilung.

Bei der Photometrie tritt eine Lichtbeugung insbesondere an der Aperturblende des Kondensors auf. Ihr Verhältnis zur numerischen Apertur des Objektivs soll etwa 1 : 3 betragen (SANDRITTER, 1958). Sie sollte auf keinen Fall kleiner als 0,1 gehalten werden, da sonst mit störenden Beugungs- und Interferenzeffekten zu rechnen ist.

(14.2 c) " Out of focus - Effekt "

Weitere Fehlerquellen, wie die Objektinhomogenität, sowie die Tatsache, daß ein zu durchstrahlendes Partikel sowohl über, als auch unter dem Brennpunkt gelegen sein kann ("out of focus-Effekt"), hatten bei früher verwendeten Geräten eine Bedeutung, bei denen relativ große Strukturen von einem einzigen Lichtbündel durch-

leuchtet wurden (Plug-Methode). Zur Behebung dieser Schwierigkeit zeichnete sich hauptsächlich der Weg des punktförmigen Messens ab (Scannen). Sind jedoch die Inhomogenitäten kleiner als die Meßfläche, dann ist es möglich, daß Fehler entstehen, die bis zu 70% des eigentlichen Meßwertes ausmachen können. Eine weitere Verkleinerung des Lichtbündels ist wegen des begrenzten Auflösungsvermögens der Optik nicht angezeigt. Der Absorptionsmeßfehler ist dadurch zu eliminieren, indem man das Präparat an zwei verschiedenen Wellenlängen mißt und aus den unterschiedlichen Ergebnissen auf die Größe des Fehlers rückschließt. Die Extinktionsmodule der beiden Wellenlängen (= Extinktion bei einer bestimmten Schichtdicke) sollen sich dabei wie 1 : 2 verhalten (SANDRITTER, 1958).

(14.2 d) Die Vorbehandlung des Materials

Von viel größerer Bedeutung, als die eben besprochenen, sind diejenigen Fehlerquellen, die bei der Vorbereitung des histologischen Materials entstehen können.

Die Vorbehandlung hat neben einer optimalen histologischen Strukturerhaltung eine möglichst ortsgerechte Fixierung der nachzuweisenden Substanz durch Fällung oder Denaturierung zu erzielen. An erster Stelle sei der Einfluß des Fixierungsmittels auf das Zellvolumen erwähnt. Der Schrumpfungseffekt, welcher vor allem quantitative Aussagen erheblich beeinträchtigen kann, ist bei sämtlichen Fixationsmethoden vorhanden, wenn auch teilweise recht minimal. Dabei besitzt sowohl die Tonizität des Fixationsmediums einen starken Einfluß auf den Wassergehalt der Zelle, als auch dessen hygroskopische Fähigkeiten. Es wäre bei den in ihrer Mehrzahl stark sauren Fixationsmedien sinnlos, durch Einstellen einer physiologischen Tonizität Schäden vermeiden zu wollen, die dann zwangsläufig durch das saure pH der Lösung verursacht werden (ARNOLD, 1968). Um

einen starken Wasserentzug zu vermeiden, verwendet man keine stark proteinfällenden Mittel, wie Alkohol, Pikrinsäure oder Sublimat (FEDERLIN und KÖSTER, 1954, Hinweis bei SANDRITTER, 1958).

Eine weitere durch die Fixierung bedingte Fehlermöglichkeit stellt der Einfluß auf die Gesamtmenge einer bestimmten Substanz dar. Proteine, Polysaccharide, oder Nukleinsäuren können durch unsachgemäße Fixiermittel hydrolisiert werden, wodurch Einzelbausteine zumindest teilweise verloren gehen. Insbesondere die Nukleinsäuren sind bei der Anwendung säurehaltiger Fixierungsmittel relativ leicht zu dezimieren (BURCK, 1966). Auch eine Erhöhung der Fixiertemperatur hat dieselbe Wirkung (SANDRITTER, PILLAT, THEIS, 1957). Als optimal hat sich unter diesen Gesichtspunkten die Carnoy-Fixation erwiesen (SANDRITTER, 1958).

Schließlich hat das Fixierungsmittel auch Einfluß auf die Gewebshomogenität, eine Tatsache, die durch die bereits erwähnte Koazervation der Nukleinsäuren besonders deutlich demonstriert wird. Durch die Inhomogenität entstehen Refraktationsindexsprünge, insbesondere nach Einwirkung von Alkohol, essigsäurehaltigen oder quecksilberhaltigen Fixationsmitteln sowie durch Osmiumsäure (siehe SANDRITTER, 1958).

(14.3) Die Gültigkeit des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes am histologischen Objekt

Zusammengefaßt ergibt sich, daß jede Behandlung des Gewebes zu erheblichen Fehlerquellen bei Absorptionsmessungen führen können. Dadurch scheint die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes und somit eine absolute quantitative Aussage in Frage gestellt.

SANDRITTER (1958) weist jedoch darauf hin, daß mit Hilfe der Schnittdickenvariation ein linearer Extinktionsanstieg an Leberzellen vermerkt werden kann. Dies spricht für die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes auch an histologischen

Objekten, obwohl das Gesetz ursprünglich nur für Lösungen aufgestellt wurde. Speziell für die Nukleinsäuren wurde dies auch von SVENSSON (1956) bewiesen. Solche Bestätigungen verlieren zwar dann etwas an Bedeutung, wenn keine absolut-quantitativen Aussagen erwünscht sind, sondern wenn verschiedene Zellpopulationen vergleichend-quantitativ einander gegenübergestellt werden sollen. Aber auch in diesem Falle ist äußerster Wert auf eine größtmögliche Konstanz in der Zubereitung und Auswertung der Präparate zu legen. Diese Forderung geht klar aus der ungemeinen Empfindlichkeit und Variabilität der Methodik hervor.

(14.4) Eichverfahren

Gemäß dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz kann nach Ermittlung der Extinktion auf die Masse des gesuchten Stoffes geschlossen werden. Diese direkte und absolute Bestimmung ist aus den bereits geschilderten Gründen sowie auch wegen weiterer, nicht kalkulierbarer Fehlerquellen mit einem sehr großen Ungenauigkeitsrisiko behaftet. Aus diesem Grund wird in der Makrospektrophotometrie der Meßwert stets auf ein Vergleichspräparat bezogen. Beispielsweise ermittelt man die Transmission in Prozenten derjenigen eines eigenen Vergleichsstrahlenganges. Bei Messung von Gesamtmengen verwendet man auch oft den Begriff Arbeitseinheit, d.h. der Meßwert wird im Leerfeld auf einen beliebigen Zeigerausschlag geeicht und dieses Ergebnis vom eigentlichen Meßwert subtrahiert.

Mit diesem Verfahren sinkt natürlich der Informationsgehalt der Messung einer Zelle erheblich. Dies läßt sich nur mit statistischen Methoden wieder ausgleichen, erst eine Vielzahl von gemessenen Zellen vermitteln wieder eine konkrete Information.

(14.5) Absorptionsspektren der biologischen Objekte

Die uns interessierenden Bausteine der biologischen Objekte besitzen charakteristische Absorptionsmaxima im Bereich zwi-

schen 200 und 400 nm, das heißt also, im ultravioletten Teil des elektromagnetischen Spektrums. Das gemeinsame aller in diesem Bereich absorbierender Stoffe ist der Besitz ungesättigter organischer Gruppen, die durch elektromagnetische Strahlung dieser Wellenlänge zu Resonanzschwingungen angeregt werden. Insbesondere die Imino-, Indol-, Phenol- und Imidazolgruppen der Proteine sowie die $C = C - C = N$ Doppelbindungen der Purine und Pyrimidine sollen hier Erwähnung finden. Bei den Proteinen liegt das Absorptionsmaximum je nach ihrer Primärstruktur zwischen 240 und 280 nm. Die DNS sowie die RNS der Zelle, die beide aus Purin- und Pyrimidinbasen aufgebaut sind, besitzen ein sehr eng benachbartes Absorptionsmaximum bei ca. 260 nm. Diese Tatsache läßt sich aus der großen Ähnlichkeit ihrer Strukturen erklären. Neben DNS und RNS besitzt auch die Adenylsäure, sowie auch Harnsäure und deren Salze ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, so dass durch die gleichzeitige Anwesenheit obiger Substanzen bedeutende Fehlermöglichkeiten bei quantitativen Auswertungen entstehen können.

Diese letztere Tatsache, sowie auch insbesondere das Bestreben, die DNS von der RNS mikrospektrophotometrisch unterscheiden zu können, führte sehr bald generell zur Suche nach Möglichkeiten, um durch die Ankopplung weiterer organischer Verbindungen das Absorptionsmaximum in einen anderen Bereich des elektromagnetischen Spektrums zu verlegen. Gleichzeitig ist dadurch die Möglichkeit gegeben, auch Stoffe nachzuweisen, deren "native" Extinktionen unterhalb jeder erfaßbaren Meßgrenze liegen, jedoch durch den Kopplungspartner ein weitaus größeres Absorptionsmaximum erlangen. Sofern es sich bei den einzuführenden Liganden um sog. normal-chromophore Gruppen handelt, Verbindungen also, die im sichtbaren Licht durch eine deutliche Farbe imponieren, ist überdies eine lichtoptische Charakterisierung des Objektes ermöglicht.

Zwei Voraussetzungen sind jedoch prinzipiell bei diesem Vorgehen zu beachten: einmal die absolute Spezifität der Bindung zwischen gesuchter Substanz und ihren Liganden, zum anderen

das Auftreten eines m.o.w. deutlichen Absorptionsmaximums in einem Bereich des Spektrums, in dem Superpositionseffekte durch andere Zellkomponenten nicht, oder nur in zu vernachlässigendem Maße auftreten.

Die Gültigkeit dieser beiden Kriterien soll im Folgenden für die hier speziell interessierende FEULGEN'sche Kernfärbung zum Nachweis der DNS untersucht werden.

XV. DIE FEULGEN'SCHE KERNFÄRBUNG

Sie ist benannt nach ihrem Entdecker, Robert FEULGEN, der diese Färbung zusammen mit ROSSENBECK 1924 erstmals in die Histologie einführte, ohne eigentlich die reagierenden Moleküle genau zu kennen. FEULGEN baute nur auf seiner eigenen Entdeckung auf, daß das Produkt aus einer milden Hydrolyse der Thymusnukleinsäure einen positiven Aldehydnachweis mit dem SCHIFF'schen Reagenz ergibt. Chemisch erklärte man sich die Wirkung der milden Säurehydrolyse nach OSBORNE und HEYL (1908) so, daß die Bindung zwischen Purinen und Zucker gebrochen wird, während die Bindung zwischen Pyrimidinen und Zucker nur durch sehr drastische Säureeinwirkung zerstört wird. Das Endprodukt dieser Depurinisierung ist schließlich ein hochpolymeres Molekül aus Zuckern, Pyrimidinen und Phosphorsäuren, die sogenannte Apurinsäure. Nach Ansicht von STACEY, DERLIAZ, TEECE und WIGGINS (1946) bekommt der Zucker die Form eines Hydroxyälevulinaldehyds, der dann mit dem SCHIFF'schen Reagenz nachweisbar ist.

Die Spezifität der von FEULGEN vorgeschlagenen Prozedur als Kernfärbung wurde allgemein sehr rasch anerkannt, da die von FEULGEN und ROSSENBECK verwendete Thymusnukleinsäure normalerweise nur im Chromatin vorkommt, so daß diese Reaktion auch sehr bald als spezieller Nachweis der Desoxypentosenukleinsäure angesehen wurde. Trotzdem befasste sich BAUER (1932 und 1933) (Hinweis bei DI STEFANO, 1948) in kritischen Untersuchungen vor allem mit der gleichzeitigen Anfärbbarkeit von oxydierten Polysacchariden und auch Lipiden, die auch ohne die zur normalen FEULGEN-Prozedur gehörenden Hydrolyse stattfindet. BAUER erkannte die FEULGEN'sche Nuklealreaktion nur dann als spezifisch an, wenn gleichzeitig nicht hydrolysierte Kontrollschnitte keine Anfärbung zeigen.

Die FEULGEN'sche Kernfärbung wird im Folgenden gemäß der Reihenfolge der einzelnen Schritte detailliert geschildert:

(15.1) Die Fixierung des Gewebes

Die ersten Mitteilungen über eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Depurinisierung von der Art der vorangegangenen Fixierung stammen von BAUER (1932). Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, daß durch die unterschiedliche Fixierung eine teilweise zeitliche Trennung der beiden Vorgänge bei der Hydrolyse, nämlich die Depurinisierung und die Depolymerisierung der Apurinsäure, stattfindet. Es scheint zu einer verschiedenen großen Stabilität, je nach Fixationsmittel, gekommen zu sein, wodurch dann die Auswaschung der Apurinsäure bei überlanger Hydrolyseeinwirkung unterschiedlich schnell erfolgt. Diese Mitteilung BAUER's wird durch DI STEFANO (1948) voll bestätigt, indem auch er eine völlig andere Hydrolysekurve je nach Carnoy- oder Fleming-Fixierung erhielt. DI STEFANO vermutet, daß die unterschiedliche Wirkung der Fixierungsmittel in einer verschiedenen festen Bindung der DNS an die ungefähr in gleichem Verhältnis in der Zelle vorkommenden Histone besteht. Beide, DNS und Histon sind stets eng assoziiert und bilden zusammen die sog. "Chromosinfraktion" (DI STEFANO, 1948), die über 90% des fettfreien Chromosomentrockengewichts ausmacht. POLLISTER (Hinweis bei DI STEFANO, 1948) berichtet über die unterschiedliche Bindungskapazität zwischen DNS und Histon an in vitro-Versuchen: werden Chromosinfaserpräzipitate in Chromsäure fixiert, so kann das Histon nicht mehr durch das übliche Hg_2SO_4 -Reagenz nachgewiesen werden; dies ist jedoch nach einfacher Essigsäure-Alkoholfixierung ohne weiteres möglich.

Gemäß dieser Erkenntnis ist es verständlich, daß nach einer Fixiermethode gesucht wurde, die einerseits die Stabilität des Nukleohistonkomplexes insoweit gewährleistet, daß auch nach einer postoptimalen Hydrolysezeit kein nennenswerter Abfall des FEULGEN - DNS - Gehaltes zu verzeichnen ist, andererseits auch nicht die erwähnten Nachteile bei der optischen Auswertung in sich birgt (siehe: "Fehlermöglichkeiten chemischer Natur").

So vergleichen DEITCH, WAGNER, RICHART (1964) die Brauchbarkeit der Fixierung mit kaltem Methanol (30'), Methanol - Formalin - Eisessiggemisch (siehe GARCIA, 1962) - 60 min.- und 10% gepuffertes Formol (18-24 Std.) miteinander und kommen zum Schluß, daß die unter identischen Bedingungen durchgeführte Hydrolyse nach Anwendung von Methanol - Formalin - Acetic Acid einen ca. 20% höheren FEULGEN-DNS ergibt. Auch das Maximum wird erst nach dem mehr als Zweifachen der für reines Methanol optimalen Hydrolysezeit erreicht und hält sich dann für ca. 1 Std. nahezu konstant. Von einer ebenso guten Hydrolyseresistenz im abfallenden Schenkel der Hydrolysekurve berichten auch BÖHM, SPRENGER, SCHLÜTER und SANDRITTER (1968 a) nach Anwendung des MEFCRAC-Gemisches. Außerdem kann zwar ein fast identischer steiler Kurvenanstieg sowohl bei alkoholfixierten als auch bei MEFCRAC-fixierten Präparaten beobachtet werden, jedoch kommt es bei der letzteren Methode zu einem breiteren Gipfelplateau. Aus diesem Grund plädieren BÖHM, SPRENGER, SCHLÜTER und SANDRITTER (1968 a) ebenfalls für die MEFCRAC-Fixierung. BÖHM (1968 b) erklärt die günstige Wirkung der MEFCRAC-Fixierung mit einer durch den Formalinanteil bewirkte Ausbildung kovalenter Methylenbrücken zwischen Amino-, Guanido-, Indol-, Phenyl- und Sulfhydrylgruppen der Aminosäuren. Dieser Vernetzungseffekt bei der Eiweißdenaturierung führt zu einer Stabilisierung des Kernchromatins und dadurch auch zu einer erhöhten HCl-Resistenz.

(15.2) Die Hydrolyse

Seit der Einführung der FEULGEN-Reaktion in die Zytologie sind einige Hydrolyseverfahren beschrieben worden (Überblick bei BÖHM, 1968 b). Die Zweckmäßigkeit dieser Variationen richtet sich nach der grundsätzlichen, speziell für quantitative Bestimmungen wichtigen Fragen: welche Faktoren bewirken die Depolymerisierung und somit die Herauslösung der Apurinsäure? Geschieht dies bereits vom Beginn der Hydrolyse an, oder erst im Gefolge der postoptimalen Hydrolyse?

JORDANOV (1963) berichtet von einer Zunahme der Pyroninophilie, die er auf die zunehmende Depolymerisierung der Apurinsäure zurückführt, während der gesamten Hydrolysedauer. Die polarisationsoptischen Messungen der Doppelbrechung nach Rivanol-Färbung (SANDRITTER, JOBST, RAKOW, BOSSELMANN, 1965b) zeigen ein Ergebnis, das dem von JORDANOV entspricht, zusätzlich auch noch über den zeitlichen Ablauf der Depolymerisierung eine Aussage macht. Danach ist aus der Anisotropiekurve von Thymuslymphozyten zu erkennen, daß die submikroskopische Struktur bis zur 3. Stunde der Hydrolyse weitgehend geändert wird. Diese Tatsache wird auch durch die Ergebnisse der Gallocyaninchromalaunfärbung als Indikator für freie Phosphatgruppen bestärkt. Hier wird durch die Abnahme des Farbstoffgehalts dokumentiert, daß zunehmend weniger Phosphatgruppen zur Farbreaktion zur Verfügung stehen, je länger die Hydrolyse andauert. Daraus ist die Schlußfolgerung abzuleiten, daß der Gehalt an Apurinsäure mit fortschreitender Hydrolyse auf Grund der partiellen Aufspaltung der Phosphodiesterbindungen und der Diffusibilität der Spaltprodukte abnimmt. JORDANOV, (1963) sowie SANDRITTER, JOBST, RAKOW und BOSSELMANN (1965 b) sind sich einig, daß dieser Prozeß bereits von Anfang an dem der Ablösung der Purine parallel läuft. DI STEFANO hielt dies noch 1948 in einer auf vergleichende mikrospektrophotometrische Messungen gestützte Studie für unwahrscheinlich und verlegte die Diffusibilität der Apurinsäurefragmente ausschließlich in den fallenden Schenkel der postoptimalen Hydrolysezeit.

Es ist also festzustellen, daß die Hydrolyse ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Freisetzung von Aldehydgruppen einerseits und der Herauslösung der Apurinsäure andererseits darstellt. Dabei tritt am Anfang die Aldehydbildung in den Vordergrund, erkenntlich an dem m.o.w. steilen Anstieg der FEULGEN - DNS - Werte. In dieser Zeit werden 50% der das UV-Licht absorbierenden Basen abhydrolysiert, (nämlich die Purine - TAMM und CHARGAFF, 1953, Hinweis bei SANDRITTER, JOBST, RAKOW, BOSSELMANN, 1965 b). Auf diesen Anstieg der Hydrolyse-

kurve folgt ein Stadium, das durch eine verhältnismäßig gute Stabilität des Hydrolyseprodukts gekennzeichnet ist, da der Verlauf der Kurve (je nach Art der Hydrolyse, siehe unten!) m.o.w. plateauförmig gestaltet ist. Die zytophotometrischen Messungen SANDRITTER's weisen darüber hinaus noch die Abspaltung von Pyrimidinen in dieser Phase nach. Es entsteht demnach jetzt ein Produkt, das zum größten Teil aus Pentose besteht und in abnehmendem Maße durch Phosphatbrücken zu einem Polymer zusammengefügt wird. Dieses dürfte mit dem w - hydroxyläeuvinaldehyd identisch sein, den STAGEY, DERIAZ, TEECE und WIGGINS (1946) auf Grund in vitro - screening - Tests als farbstoffbindendes Molekül postuliert haben. JOBST weist 1962 eindeutig nach, daß es sich bei der Plateaubildung nicht um ein Gleichgewicht zwischen Aldehydbildung und Abdiffusion der Purinbasen handelt; diese Vermutung wäre nach dem bisher Erläuterten eigentlich naheliegend. Der Nachweis von Aldehydgruppen, die neu entstehen müssten, mittels Reduktion durch Natriumborhydrid, verläuft jedoch in der Plateauphase negativ.

Nach der Plateauphase der Hydrolysekurve kommt es zu einer sukzessiven Lösung der Abbauprodukte der Nukleinsäuren aus dem Zellkern und somit zur Abnahme der Farbreaktion. Diese Phase ist gekennzeichnet durch die abfallende Tendenz der Hydrolysekurve.

Richtet man nun, nach dieser Darstellung der prinzipiellen Charakteristik einer Nukleinsäuren-Hydrolysekurve, sein Augenmerk auf den Hydrolyseverlauf bei verschiedenen Zellarten, so fällt auf, daß Unterschiede bestehen: bei identischer Behandlung erreichen Leberzellkerne das Maximum erst nach über dem 1,5 fachen an Zeit als Thymuszellkerne; bei Bullenspermien ist diese Zeitspanne schließlich mehr als doppelt so groß als bei Thymuslymphozyten (SANDRITTER, JOBST, RAKOW, BOBBELMANN, 1965 b). Auch bilden Bullenspermien eine wesentlich längere Plateauphase als die sich in dieser Hinsicht ziemlich ähnlichen Leber- und Thymuszellen. Verleicht man nun obendrein die mikroskopischen Bilder zu verschiedenen

Zeitpunkten der Hydrolyse, so erkennt man unabhängig von der Zellart, daß ab der Plateauphase fast nur noch die kondensierten Teile des Chromatins in Erscheinung treten. Die euchromatischen Anteile des Zellkerns sind in der postoptimalen Phase nahezu vollständig herausgelöst. Kann man sich demnach die Hydrolysekurve eines Kerns als Summierung von Einzelkurven zweier unterschiedlich säureempfindlicher Strukturen vorstellen? Diese Frage wurde von SANDRITTER und BOHM (1964 b) an Hand der deutlichen Hydrolyseunterschiede zwischen normalen Zellen und Ascitestumorzellen aufgeworfen. Letztere besitzen nicht nur einen steileren Anstieg der Kurve, sondern auch eine deutliche, statistisch gesicherte Inflexion. SANDRITTER und BOHM (1964 b) diskutierten die Möglichkeit zweier Typen von Nukleoproteinen, wobei bei den Tumorzellen der säurelabile Anteil überwiegen würde. Die Kurveninflexion wäre demnach durch Überlagerung von zwei eingipfligen Kurven bedingt, mit unterschiedlichen Maxima. DE CCSSE und AIELLO (1966) konnten bei Hydrolyse normaler menschlicher Lymphozyten, im Gegensatz zu SANDRITTER und BOHM (1964 b) keine Zweigipfligkeit feststellen.

Ein weiterer Beitrag zu der Frage nach unterschiedlich säurelabilen Anteilen des Kerns wird von BRACHET, HULIN und GUERMANT (1968) mit Hinsicht auf die Zelldifferenzierung geleistet. In dieser Arbeit kommt vor allem die Komplexität dieses Problems zum Ausdruck, das heute noch nicht zu Gunsten einer der beteiligten Faktoren beantwortet werden konnte. Jedenfalls scheint die Auffassung von SANDRITTER, JOBST, RAKOW und BOESSELMANN (1965 b) das Problem auf den relativen Eucheterochromatingehalt zurückführen zu können, eine nicht zu vertretende Vereinfachung des Problems darzustellen. Vielmehr ist auch der Gehalt an Kern-RNS mit in diese Überlegungen einzubeziehen; schließlich unterliegt die RNS der Hydrolyse in genau derselben Weise wie die DNS. Weiterhin scheint auch der Gehalt an Protein, speziell des an die DNS gebundenen Anteils bei der Säurelabilität eine Rolle zu spielen (DI STEFANO, 1948). Auch der Einfluß des Mitosestadiums ist nicht unerheblich. So

finden BENES und RCTREKLOVA (1966), daß eine 60°C - 1N HCl-Hydrolyse von acht Minuten bei Zellen der S-Phase zu fast 50% Verlust an DNS führt, während sich G_1 -Zellen gegenüber derselben Prozedur nahezu stabil verhalten.

Unter dem Aspekt, daß die endgültige Lösung dieses Problems noch offen ist und deshalb die Unterschiedlichkeit der Kurven noch nicht eindeutig interpretiert werden kann, erhebt sich die Forderung nach einem, möglichst allen individuellen Variationsmöglichkeiten gerecht werdendem Hydrolyseverfahren. Erst dann, wenn das Optimum auf eine längere Plateauphase ausgedehnt ist und nicht, wie bei der klassischen 1N - 60°C - Hydrolyse 1 - 2 Minuten beträgt, ist es möglich, mit einer minimalen Fehlerbreite quantitative Vergleiche anzustellen. Diese Forderung nach einer sog. "Langzeithydrolyse" wird von einem anderen Befund noch unterstützt: JORDA-NOV (1963) äusserte die Vermutung, daß nicht die Konzentration der Säure für die Depolymerisierung verantwortlich sei, sondern einzig die Temperatur. Aus diesem Grund kann mit Wasser von 60°C derselbe Effekt herbeigeführt werden, wie mit 1N HCl von 60°C .

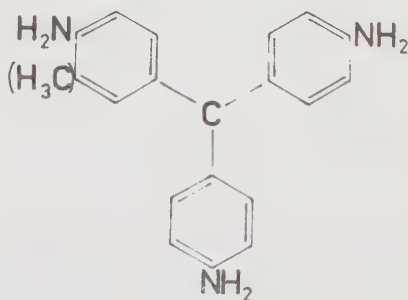
Die Temperaturabhängigkeit bestätigen sowohl DECOSSÉ und AIELLO (1966), als auch BÖHM (1968 b), obgleich letzterer der Art der Fixierung mindestens ebensoviel Bedeutung für die Diffusibilität einräumt, wie der Temperatur. Diese zuletzt genannten Autoren, sowie DEITCH, WAGNER und RICHART (1968) schlagen vor, die Hydrolyse bei Raumtemperatur durchzuführen. Sie berichten außerdem von einer Erhöhung der FEULGEN - DNS-Werte bei 5N HCl von $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ um 5 - 30%. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch BÖHM (1968 b), der verschiedene Säurekonzentrationen auf ihre Tauglichkeit bei der Langzeithydrolyse bei einer Temperatur von $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ miteinander vergleicht.

Hierbei zeigt sich eine Überlegenheit der Langzeithydrolyse mit einer Säurekonzentration von 4-5 N HCl; die Unterschiede der Maximalwerte zwischen 4N und 5N HCl sind nur gering. Das Kurvenplateau ist gut ausgeprägt, so daß kleine Schwankungen

in der Hydrolysedauer keinen ins Gewicht fallenden Einfluß auf eine quantitative DNS-Bestimmung haben können. Weiterhin wird in der Studie von BÖHM (1968 b) ausdrücklich der große Einfluß der Fixierung, speziell auf den fallenden Schenkel der Hydrolysekurve betont. Formalinhaltige Fixierungsmittel besitzen demnach einen ausgesprochen stabilisierenden Effekt.

(15.3) Die Farbreaktion

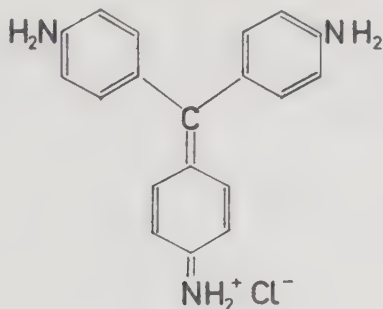
Die bei der Hydrolyse entstandenen Aldehydgruppen werden anschließend mit dem Schiff'schen Reagenz zur Reaktion gebracht und somit nachgewiesen. Dieses gehört zur Klasse der Triaminotriphenylmethanverbindungen, welche auf Grund ihrer Aminogruppen basischen Charakter besitzen und primär in der in Formel 1 gezeichneten Form vorliegen:



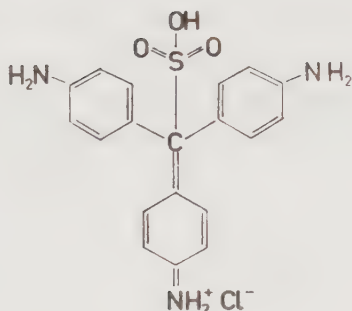
Diese einfachen Basen, die keine Chinonstruktur besitzen, sind farblos und werden in Rosanilin (mit ringständiger CH_3 -Gruppe) und in Pararosanilin (ohne CH_3) unterschieden. Im weiteren soll nur an Hand der letzteren Base die Farb-reaktion diskutiert werden, da nur diese bei der Herstellung der Schiff'schen Reagenz Eingang gefunden hat.

Der farbgebende Charakter dieser Moleküle ist prinzipiell an die salzsauren Salze (mit Chinonstruktur) gebunden; diese tragen die Namen Fuchsin und Parafuchsin.

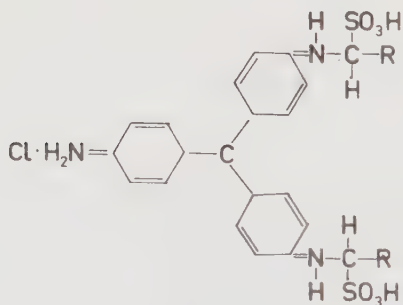
Bei der Herstellung des Schiff'schen Reagenz wird nach GRAU-MANN (1953) so verfahren, daß man soviel Pararosanilin in 1N Salzsäure löst, daß die am Ende im gesamten Ansatz erreichte Farbstoffkonzentration zwischen 0,125 und 0,5 % liegt. Andernfalls kommt es zur Präzipitation des Pararosanilins. Gleichzeitig wird durch die HCl die Bildung des salzsauren Salzes herbeigeführt:



Durch Zugabe von Kaliummetabisulfit wird durch den Einfluß des pH, der kleiner als 3 ist, aus dieser Verbindung schweflige Säure freigesetzt, die sich mit dem Triphenylmethanmolekül in der in Formel 3 dargestellten Weise zu fuchsin-schwefliger Säure verbindet. Diese Verbindung ist wiederum farblos!



Bei der Reaktion lagert sich diese Struktur nochmals um (Formel 4) und verbindet sich nun durch die SO_2H -Gruppen mit zwei Aldehydmolekülen.



Diese Reaktion wird normalerweise bei Zimmertemperaturen durchgeführt. DUTT (1969) beschreibt ein Verfahren, bei dem durch die Erhöhung der Temperatur auf $30-40^\circ\text{C}$ bessere Färbere-sultate erzielt werden. Der Autor führt dies auf den mit der Temperatur zunehmenden Verlust des mit der fuchsinschwef-ligen Säure konkurrierenden freien SO_2 zurück.

Anschließend an den ca. 1 - 1,5 Stunden dauernden Färbevorgang wird das Präparat mit einer Lösung von Kaliummetabisulfit differenziert. Dabei kommt es zu einer Abbindung aller nicht an der Kernreaktion beteiligten Fuchsinmoleküle zu erneut farbloser fuchsin-schwefliger Säure.

(15.4) Spezifität der Farbreaktion und deren Ausnahmen

Von großer praktischer Bedeutung ist die Frage nach der Spezifität dieser Reaktion auf die DNS. Warum kommt es nicht zur Reaktion mit der in derselben Weise hydrolysierten RNS? Daß diese nicht an der farbgebenden Reaktion beteiligt ist, beweisen Färbeversuche nach vorhergehender enzymatischer Herauslösung der DNS : keine Anfärbbarkeit im Gegensatz zu DNS-haltigen Kontrollschnitten (WHEELER, 1969).

BURCK (1966) führt die Spezifität der DNS-FEULGEN-Reaktion auf die für die DNS charakteristischen Abstände zwischen den Aldehydgruppen von 10 - 11 Å zurück. ARNOLD (1968) hingegen glaubt, ohne die von BURCK genannte Möglichkeit ausdrücklich abzulehnen, daß die eigentliche Spezifität darin liege, daß die RNS durch die vorangehende Behandlung bereits entfernt würde. Letztlich besteht jedoch Übereinstimmung über die unbedingte Aussagekraft dieser Reaktion hinsichtlich des DNS-Nachweises, sofern das Präparat stets konstanten Bedingungen unterliegt. Unter diesem Vorbehalt erkennen auch SRINIVASACHAR und PATAU (1959) eine Proportionalität zwischen DNS-Gehalt und FEULGEN-DNS-Wert an.

(15.5) Stöchiometrie der FEULGEN-Färbung

Die Überlegungen zur quantitativen Brauchbarkeit der FEULGEN-Reaktion stützen sich weiterhin auf den Nachweis des stöchiometrischen Umsatzes des Farbstoffs mit der DNS. Hiermit beschäftigte sich bereits 1932 CASPERSSON; er zeigte, daß eine lineare Beziehung zwischen dem Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs und der Konzentration der Thyminukleinsäure be-

steht und er weist darauf hin, daß die Methode mit einer Genauigkeit von 1% innerhalb einer Nukleinsäurekonzentration von 0,05 - 1% verwendet werden kann. In Anlehnung an die klassische Konzeption von WIELAND und SCHEUING (1921) muß man übereinstimmend mit CASPERSSON annehmen, daß das farbgebende Produkt aus der Reaktion eines Moleküls fuchsin-schwefliger Säure mit zwei Nukleotidmolekülen entsteht. Das heißt, daß ein Grammäquivalent des Färbemittels mit zwei Grammäquivalenten Purin-Nukleotide reagiert. Nachdem aber nur die Hälfte aller Nukleotide Purine besitzen, wird ein Farbstoffmolekül äquivalent zu vier Nukleotidmolekülen sein.

Es soll noch Erwähnung finden, daß auch andere im Kern vorhandene Substanzen die FEULGEN-Reaktion meist indirekt beeinflussen. Obgleich dies für qualitative Anfärbungen belanglos sein mag, ist diesem Phänomen bei quantitativen Analysen doch Aufmerksamkeit zu schenken. So beobachtete BAUER 1932, 1933 (Hinweis bei DI STEFANO, 1948) neben der Kernreaktion eine positive FEULGEN-Reaktion im Zytoplasma. Aus diesem Grund wird letztere Reaktion, welche im Gegensatz zur Nuklealreaktion auch ohne Hydrolyse, jedoch nach HgCl_2 -Behandlung demonstriert werden kann, als Plasmalreaktion bezeichnet. Die in den folgenden Jahren unternommenen chemischen Studien führten zur Bestimmung des Plasmalogens als eine neue Lipoidsubstanz, die eine Vinylätherstruktur besitzt (TURNER und HAYES, 1961). Durch die normale Vorbereitung des Schnitts als auch des Abklatschmaterials wird das Plasmalogen jedoch herausgelöst.

Weiterhin nehmen die an die Nukleinsäuren assoziierten Proteine einen Einfluß auf die Farbstoffbindekapazität (Übersicht bei KIEFER G., KIEFER R. und SANDRITTER, 1968). Dies trifft nicht nur für die FEULGEN-Reaktion, sondern auch für die Gallocyaninchromalaunfärbung zu (SANDRITTER, KIEFER G., RICK, 1963). Die Eliminierung dieser Proteine oder das Blockieren der kationischen Gruppen läßt daher die Menge der gebundenen Farbstoffmoleküle ansteigen (KIEFER G., KIEFER R., SANDRITTER, 1968). Es ist zu bedenken, ob nicht hierdurch unterschiedliche Färbintensitäten bedingt werden können. Wahr-

scheinlich sind nicht nur die kationischen Gruppen der Proteine verantwortlich, sondern auch die unterschiedlich dichte Packung im Sinne eines sterischen kompetitiven Effekts. So fand WILKINS (1963) eine extrem dichte Packung der Nukleoproteine in kernhaltigen Erythrozyten, die obendrein noch aus stark basischen Protaminen oder zumindest sehr ähnlichen Substanzen bestehen (BLOCH und HEW, 1960). Diese Zellen, wie auch die Spermienköpfe, binden weniger Farbstoff pro DNS als sonstige Zellen (SANDRITTER, KIEFER G., RICK, 1963). GARCIA (1967) berichtet von einer um 10% niedrigeren Farbstoffbindekapazität bei Spermien als bei Spermatiden. MAYALL (1967) berichtet von einem ebenso großen Unterschied zwischen Monozyten und Lymphozyten sowie zwischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Dabei scheint sich die um 10% niedrigere Farbstoffbindekapazität der Lymphozyten unmittelbar vor der Teilung, also in der späten G_2 -Phase, aufzuheben. MITTWOCH (1969) schließlich, untersuchte die FEULGEN-DNS-Werte bei zwei Sorten von Fibroblastenkernen, solchen mit und solchen ohne ausgeprägten Chromozentren. Sie stellte bei ersteren einen im Durchschnitt 5,93% niedrigeren FEULGEN-DNS-Wert fest.

ZUSAMMENFASSEND ist also zu bemerken, daß bei extremen Formen der Chromozentrenbildung, genau so wie bei den Spermien, nicht nur die Inhomogenität des Präparates einen Fehler bei der Mikrospektrophotometrie bedingt, sondern daß gerade in diesen Fällen durch die Farbreaktion ein weiterer, wenn auch meist gut kalkulierbarer Fehler in die Messung gelangt.

(15.6) Weitere Behandlung

Die feulgengefärbten Präparate sollen im Dunkeln aufbewahrt werden. Sowohl KASTEN, KIEFER G., SANDRITTER (1962) als auch BENWITZ 1965 stellten eine Deformierung der Absorptionskurven sowie auch eine Abnahme der absoluten Extinktionswerte fest, sofern die Präparate dem Licht (z.B. eines Photometers) ausgesetzt waren. Der Bleicheffekt ist besonders stark in der ersten Zeit der Lichteinwirkung, der Verlust beträgt je nach

Vorbehandlung zwischen 27 und 81%. KASTEN, KIEFER G., SAND-
RITTER (1962) sehen die Wirkung des Lichtes auf die Farb-
stoffmoleküle in einem teilweisen Verlust der Chinonstruktur
und somit auch des salzsauren Charakters.

C M A T E R I A L u n d M E T H O D I K

I. MATERIAL

Zur Untersuchung gelangten vier leukosekranke Schafe aus einer Herde mit enzootisch auftretender lymphatischer Leukose (ULBRICH, BEST, PAULSEN, NITZSCHKE und FRITZSCHE, 1970). Zwei Tiere wurden getötet und sofort seziiert (Nr. 1125/70 und Nr. 1787/70), ein Tier (Nr. 510/70) starb spontan und gelangte ca. 2 Stunden post mortem zur Sektion. Bei einem weiteren Schaf (Nr. 1111/70) wurde unter Lokalanästhesie der linke Buglymphknoten zur weiteren Untersuchung entnommen.

Zum Vergleich wurden 2 leukoseunverdächtige Schafe aus dem Sektionsgut des Veterinär-Pathologischen Instituts herangezogen. Beide Tiere (293/71; 294/71) stammten aus einem Listeriose-infektionsversuch und wurden unmittelbar nach der Tötung zerlegt.

II. METHODIK

(2.1) Präparation

Buglymphknoten (510, 1111, 1125), Kehlgangslymphknoten (1787) und Mesenteriallymphknoten (510) der leukosekranken sowie Buglymphknoten der leukoseunverdächtigen Schafe wurden zur zytometrischen Auswertung herangezogen. Von einer frischen Schnittfläche wurden auf reinweiße Objektträger (Fa. Fischer, Frankfurt/Main) Abklatsche angefertigt. Nach 5-minütiger Lufttrocknung erfolgte 75 Minuten lang Fixierung in einem Gemisch aus Methylalkohol-Formalin (36%)-Eisessig (85 : 10 : 5). Anschließend 25-30 Minuten lang Wässerung in fließendem Leitungswasser.

Die Feulgen-Reaktion wurde nach der von BÖHM (1968 b) angegebenen Methode durchgeführt. Teilweise wurden Präparate aus leukotischen und unveränderten Lymphknoten gleichzeitig behandelt.

- a) Hydrolysiert wurde mit jeweils frisch angesetzter 4 N Salzsäure (Titrisol-Merck) 120 Minuten in einem Wasserbad von 28°C. Anschließend wurde ca. 1 Minute in Aqua dest. gespült.
- b) Die Präparate wurden 105 Minuten bei Zimmertemperatur in Schiff'sches Reagens gebracht. Dieses wurde nach GRAUMANN (1953) mit Pararosanilin (acridinfrei) (Chroma G.m.b.H., Stuttgart) selbst hergestellt und vor Gebrauch ca. 1 Woche bei 4-5°C aufbewahrt.
- c) Mit einer sulfit-haltigen Lösung wurde 3 x 10 Minuten gespült. Diese wurde zu Beginn der Hydrolyse jeweils frisch angesetzt (200 ml Leitungswasser, 10 ml einer 10% $K_2S_2O_5$ -Lösung, 10 ml 1 N HCl).
- d) Die Präparate wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 80%-, 90%-Äthanol, 2 x Isopropanol, 2 x Xylol, je 10 Minuten) entwässert und mit Eukitt eingedeckt. Bis zur Messung wurden die Präparate im Dunkeln aufbewahrt.

Von weiteren Abklatschpräparaten wurde außerdem eine H.E.-, Giemsa-, sowie Methylgrün-Pyroninfärbung angefertigt. Diese letzteren Präparate wurden zur Differenzierung des Zellbildes herangezogen.

Von allen Tieren wurden außerdem zur histologischen Diagnose Lymphknoten und Organmaterial unmittelbar nach der Zerlegung in 6% Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit H.E. gefärbt.

(2.2) Messung

Die Messungen erfolgten an Universal-Mikro-Spektrophotometern (UMSP 1) der Firma Carl Zeiss, Oberkochen. Die Geräte sind mit Xenonlampe, Monochromator und Ultrafluar-Optik (Kondensor $NA < 0,5$; Objektiv 100 x, $NA 1,25$) ausgestattet. Größe des Meßpunktes in Objektebene 0,5 μm , Größe der Leuchtfeldblende in Objektebene 2 μm . Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 560 nm durchgeführt.

Zur Bestimmung des Gesamt-DNS-Gehaltes wurde ein UMSP 1 mit Schnellmeßzusatz und angeschlossenem synchronen Schrittmotor des Strahlenzentrums der Justus Liebig-Universität verwendet. Dabei wird das Präparat mit einer Geschwindigkeit von 50 Einzelschritten pro sec. mäanderförmig bewegt. Der Abstand der Einzelschritte beträgt $0,5 \mu$, die (horizontale) Zeilenlänge, je nach Kerndurchmesser, $9-16 \mu$, der Zeilenhub (= Abstand zweier Zeilen) $0,5 \mu$.

Sämtliche so über der durchwanderten Fläche ermittelten Extinktionswerte wurden summiert und vom Schnellmeßzusatz digital angezeigt. Diese Summe stellt das Produkt aus mittlerer Extinktion der gefärbten Zellkerne und deren Kernfläche dar. Es ergibt ein relatives Maß für die Farbintensität und damit für den zu untersuchenden DNS-Gehalt. Die gefundenen Zahlen werden Arbeitseinheiten (AE) genannt.

Mit dem restlichen Teil der Präparate wurden am UMSP 1 des Instituts für Biochemie und Endokrinologie der Tiere an der Tierärztlichen Fakultät der Justus Liebig-Universität Punktmessungen durchgeführt. Dieses Gerät besitzt keinen Schnellmeßzusatz und stellt somit die Grundeinheit eines UMSP 1 dar. Meßblende: $0,4 \mu$ in Objektebene.

Das Präparat wurde dabei mit dem Lichtstrahl ausschließlich in der Vertikalen mit Hilfe des Zeilensprungbegrenzungsknopfes abgetastet. Zeilenhub: $0,5 \mu$. Der jeweils erzielte Transmissions-bezw.(prozentuale) Absorptionswert wurde am Schreibgerät des UMSP direkt abgelesen und notiert. Dies geschah in analoger Anordnung wie das Durchwandern des Präparates. Die Verschiebung des Objektes in horizontaler Richtung um jeweils $0,5 \mu$ erfolgte manuell unter Kontrolle am entsprechenden Mikroskop.

In den auf diese Weise erhaltenen Zahlenrastern der Absorptionswerte werden jeweils diejenigen Meßpunkte, die sich gegenüber ihren unmittelbaren Nachbarn um nicht mehr als 4 Absorptionseinheiten unterscheiden, zu einem gemeinsamen Feld zusammengefaßt. In Grenzfällen wird auch eine Differenz von 5 Absorptionseinheiten toleriert. Die Gemeinsamkeit einer Zahlen-

gruppe wird durch deren Umrandung betont. Unter Umständen kann ein Meßpunkt allein einen Absorptionsbereich repräsentieren. Es wird dadurch eine Abgrenzung gegenüber allen Nachbarbereichen erzielt, die 4-5 Absorptionsstufen höher oder niedriger rangieren.

Die Abstufungsgröße von mindestens 4-5 Absorptionseinheiten wird deshalb gewählt, da dieser Wert hinreichend sicher erscheint, um zwei benachbarte Meßpunkte unterscheiden zu können. Beträgt die Differenz zwischen zwei benachbarten Punkten nur drei Einheiten, so wird die gegenseitige Abgrenzung mit einer unterbrochenen Linie dargestellt. Eine großzügigere Wahl der Abstufung erscheint andererseits auch nicht angebracht, da dann größere Absorptionswertunterschiede innerhalb eines Trennniveaubereiches hätten in Kauf genommen werden müssen.

Für alle untersuchten Zellkerne wird ein Schema der Absorptionsbereiche erstellt, um hiermit für sämtliche Kerne einen Vergleich ziehen zu können, in welchen Grenzen sich diese Bereiche bewegen. Nach der Mehrheit der übereinstimmenden Abstufungsbereiche wird dann ein für alle Zelltypen gemeinsames Schema entwickelt, das insgesamt 11 Bereiche und entsprechend 10 Zwischenbereiche enthält. Die Nummerierung beginnt mit 1 bei dem höchsten und endet mit 11 bei dem Bereich, der die Absorptionswerte 30-34 umfaßt. Niedrigere Absorptionswerte als 30 bleiben unberücksichtigt (Abb. 1).

Zur Auswahl der ausgemessenen Zellkerne eines Präparats (mindestens 20 Stück pro Fall), die für vergleichende Studien geeignet sind, wird deren Gesamt-DNS-Gehalt aus der Summe der Einzelwerte ermittelt. Als Maßeinheit wird hier ebenfalls die Angabe in "Arbeitseinheiten" verwendet. Nur in den Fällen, bei denen eine Zuordnung zur G₁-Phase möglich erscheint, wird schließlich eine Nummerierung nach oben genanntem Schema durchgeführt. Zu diesem Zweck werden zuerst von dem Feldermuster der Zellkerne Kopien angefertigt, welche nur noch die Umrisse der einzelnen Bereiche enthalten, nicht mehr jedoch die einzelnen für die weitere Kennzeichnung störenden Absorptionswerte.

Die insgesamt 21 möglichen Abstufungsbereiche werden mit 7 verschiedenen Schraffurtypen versehen. Dabei werden je drei Größenordnungen der Niveaubildung zu einem bestimmten Schraffiermuster zusammengefaßt (Abb. 2). Die Dichte der gezeichneten Schraffurlinien soll unmittelbar einen Eindruck von der Größe der hier vorhandenen Absorptionswerte vermitteln. Soweit dies jedoch nur schwer möglich ist, sollen Zahlenangaben den Informationswert unterstützen.

Bei der Ermittlung des Gesamt-DNS-Gehaltes (in AE) der Zellkerne mit Einzelmessungen wird gleichzeitig die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Absorptionswerte ermittelt. Diese Werte werden jeweils für die G_1 -Zellen zusammengefaßt und in Form eines Absorptionshäufigkeitsdiagramms zur Darstellung gebracht.

Weiterhin werden mit Hilfe der Produkte Häufigkeitswert $\times$ Extinktion sog. "Absorptionsniveaukurven" erstellt. In einem Diagramm werden auf der Abszisse der mittlere Gesamt-DNS-Gehalt der G_1 -Population aufgetragen, auf der Ordinate die Absorptionsstufen. Bei der Erstellung der Kurve wird nun jeweils im Abstand von 10 Absorptionseinheiten eine Niveautrennlinie gesetzt, d.h. alle unter diesem Niveau vorkommenden Absorptionswerte sollen nicht mehr an der Bildung des mittleren Gesamt-DNS-Gehaltes teilhaben. Je stärker ein bestimmter Absorptionsbereich vertreten ist, d.h., je mehr dieser Bereich zur Größe des mittleren Gesamtwertes beiträgt, umso bedeutender wird sich der Gesamt-DNS-Betrag nach Setzen einer Niveautrennung erniedrigen. Das sich so ergebende Kurvenbild wird also eine der einfachen Häufigkeitsverteilung entsprechende Charakteristik zeigen. Dabei ist der Ausgangspunkt einer Kurve auf der Abszisse umso weiter rechts gelegen, je mehr mittleren Gesamt-DNS-Gehalt die betreffende G_1 -Population besitzt. Der Schnittpunkt auf der Ordinate liegt umso höher, je häufiger diese Absorptionswerte angetroffen werden. Bei völlig uniformer Absorptionswertverteilung wäre der Verlauf bis zum Schnittpunkt mit der Ordinate linear. Besteht jedoch eine heterogene Absorptionswertverteilung, so resultiert dies in einem m.o.w. sigmoiden Verlauf (SANDRITTER, KIEFER G., SCHLÜTER und MOORE, 1967).

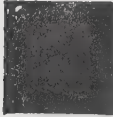
Abb. 1

Absorptionsbereiche der Niveauabgrenzung

1	2	3	4	5	6
78 - 83	74 - 78	68 - 74	63 - 68	58 - 63	53 - 58
48 - 53	43 - 48	38 - 43	34 - 38	30 - 34	26 - 30
7	8	9	10	11	12

Abb. 2

Schraffiermuster

	1		7
	1-2		7-8
	2		8
	2-3		8-9
	3		9
	3-4		9-10
	4		10
	4-5		10-11
	5		11
	5-6		11-12
	6		12
	6-7		

Um die unterschiedlichen Verlaufstypen der Kurven miteinander vergleichen und besser interpretieren zu können, ist es nötig, die Anfangs- und Endpunkte an den Achsen des Diagramms zu normieren (Normierte Absorptionsniveaukurve). Die in der obigen Darstellungsform absolut aufgetragenen Abszissenwerte werden nun in Prozentsen, bezogen auf den jeweiligen mittleren Gesamt-DNS-Gehalt, bei Absorptionsniveau Null (= 100%) ausgedrückt. Genau so wird auch die höchste Absorptionsstufe von jedem Fall mit 100% der weiteren Ordinateneinteilung zugrunde gelegt.

Die für die Absorptionsniveaukurven zugrunde gelegten Werte werden auch für die statistische Auswertung benützt. Dabei wird die gegenseitige Abgrenzbarkeit im Student' t-Test errechnet (SACHS, 1968). Als Sicherheitsschwelle wird ein Wert von $\alpha = 0,025$ zugrunde gelegt.

Sowohl für die normalen Lymphozyten als auch für die vier Leukosefälle wird für einen bestimmten Meßpunkt die spektrale Verteilung seiner Absorptions- bzw. Transmissionswerte bestimmt. Der gemessene Wellenlängebereich erstreckt sich von 650 nm bis 440 nm. Um die Vergleichbarkeit der gewonnenen Kurven zu gewährleisten, wird der Anfangswert der Absorption bei 650 nm auf 39-40% festgelegt. Nur über einem Meßpunkt, der dieser Voraussetzung genügt, wird die spektrale Absorptionswertverteilung bestimmt.

D E R G E B N I S S E

I. PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE SOWIE HISTOLOGISCHE BEFUNDE

a) Normales Lymphknotengewebe

Pathologisch-anatomischer Befund: Buglymphknoten
ca. kirschgroß, o.b.B.

Histologischer Befund: deutliche Lymphfollikelzeichnung in der Rinde

Differenzierung des Zellbildes (Abklatschpräparat):

unter 500 ausgezählten Zellen befinden sich 469 kleinkernige Zellen (= 93,8%) mit einem schwach ausgeprägten, pyroninophilen Zytoplasmasaum (kleine Lymphozyten). Weitere 31 Zellen (= 6,2%) besitzen einen großen runden Kern sowie einen deutlich ausgeprägten pyroninophilen Zytoplasmasaum (große Lymphozyten).

b) Fall Nr. 510/70

Schaf, weiblich, ca. 5 Jahre alt.

Seit Juni 1968 persistierende Lymphozytose mit Maximalwerten von 99% Lymphozyten bei 200500 Leukozyten/mm³ kurz vor dem Tode.

Seit Dezember 1969 wurde eine Schwellung der palpierbaren Körperlymphknoten festgestellt.

Das Tier starb am 6.10.1970 frühmorgens. Die Zerlegung fand ungefähr 2 Stunden später im Veterinär-Pathologischen Institut statt.

Pathologisch-anatomischer Befund:

Tierkörper stark kachektisch.

Lymphknoten: alle Körper- und Organlymphknoten gänseei- bis faustgroß. Schnittfläche diffus, grau, markig; keine Trennung in Rinde und Mark; Konsistenz derb.

Milz: stark vergrößert (ca. 20 x 10 x 3 cm); rote Pulpa vermehrt; deutliche Hyperplasie der Follikel (bis glasstecknadelkopfgroß, grauweiß, teilweise konfluierend).

Knochenmark: gallertartige Atrophie.

Lunge: in den dorsalen Teilen der Hauptlappen einzelne Lungenwurm-, sowie Brutknötchen. Chronisch-eitrige Bronchopneumonie; fibrinöse Pleuritis der Spitzenlappen. Mittelgradiges Lungenödem.

Hydrothorax: (300 ml)

Übrige Organe o.b.B.

Pathologisch-histologischer Befund:

Lymphknoten: unter völligem Verlust der normalen histologischen Struktur besteht eine sehr dichte Infiltration mit Zellen, welche in der überwiegenden Zahl durch große, dichte Kerne imponieren. Die Zellen besitzen nur einen spärlichen Zytoplasmasaum, in den Kernen sind mehrere kleine, sehr kompakte Chromozentren ohne eine spezifische Anordnung zu erkennen.

Milz: diffuse, teils sehr dichte Anhäufung von Zellen desselben Aussehens wie die in den Lymphknoten beobachteten. Die normale Milzstruktur ist nicht mehr zu erkennen.

Leber: starke periportale Infiltrate von Zellen desselben Aussehens wie in den Lymphknoten. Diese Zellen dringen in unregelmäßiger streifenförmiger Weise, z.T. in spärlicher Menge, zwischen die Leberzellbalken ein.

Lunge: ausgeprägte katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie. Um die Bronchien teilweise sehr massive, mantelförmige Anhäufung von Zellen des in den Lymphknoten beobachteten Typs. Im Interstitium vereinzelt spärlich Infiltratzellen desselben Typs.

Skelettmuskulatur: gelegentlich lockere Herde von Zellen des in den Lymphknoten beschriebenen Typs.

Haut: in der Subkutis größere Ansammlung von leukotischen Zellen, z.T. auf die Epidermis übergreifend.

Gesamtdiagnose:

vorwiegend unreifzellige lymphatische Leukose.

Differenzierung des Zellbildes:

in den Abklatschpräparaten sind ausschließlich großkernige Zellen mit spärlicher Pyroninophilie vorhanden.

c) Fall Nr. 1111/70

Schaf, weiblich, ca. 5 Jahre alt.

Seit Juni 1968 persistierende Lymphozytose ($12-17000$ Lymphozyten/ mm^3). Die palpierbaren Lymphknoten waren seit Juli 1970 mittelgradig vergrößert. Maximalwert der Lymphozytose im September-Oktober 1970: $12-17000/\text{mm}^3$ (55,8-80%) bei $20-23000$ Leukozyten/ mm^3 .

Am 11. November 1970 wurde der linke Buglymphknoten exstirpiert.

Pathologisch-anatomischer Befund:

Buglymphknoten ca. klein-zwetschengroß, Rindenregion grau, bis 0,5 cm breit, gut gegenüber der bräunlichen Markregion abgesetzt.

Pathologisch-histologischer Befund:

Abgrenzung zwischen Mark und Rinde gut möglich. Deutliche Vergrößerung der Lymphfollikel der Rinde. Überwiegend im Mark lockere Infiltrate mit großkernigen Zellen, welche ein deutlich scholliges Chromatingerüst erkennen lassen. Die Zellen besitzen nur einen spärlichen Zytoplasmasaum.

Gesamtdiagnose:

vorwiegend reifzellige lymphatische Leukose.

Differenzierung des Zellbildes (Abklatschpräparat):

Unter 500 ausgezählten Zellen befinden sich 449 kleinkernige Zellen (89,8%) mit nur sehr schwach ausgeprägter Pyroninophilie, weitere 8 mit kleinen Kernen und sehr starker Pyroninophilie (1,6%) (kleine Lymphozyten und Plasmazellen), 40 grobkernige Zellen (8%) mit deutlicher, sowie 3 ebenfalls grobkernige Zellen (0,6%) mit stark ausgeprägter Pyroninophilie (große Lymphozyten und Lymphoblasten).

d) Fall Nr. 1125/70

Schaf, weiblich, ca. 5 Jahre alt.

Das Tier zeigte seit ca. 2 Jahren eine persistierende Lymphozytose (Maximalwert: 32200 Leukozyten, 89% Lymphozyten pro mm³) und seit ca. 3 Monaten eine starke Schwellung der palpierbaren Lymphknoten.

Das Tier wurde am 29. 5. 1970 in moribundem Zustand wegen starker Kachexie, sowie Pneumonieerscheinungen getötet.

Pathologisch-anatomischer Befund:

Hochgradige Kachexie.

Lymphknoten: alle Körper- und Organlymphknoten vergrößert (Buglymphknoten und Lymphknoten an der kleinen Kurvatur des Labmagens hühnerei- bis gänseeigroß; übrige Lymphknoten kirsch- bis hühnereigroß). Schnittflächen der Lymphknoten: homogen, grauweiß, markig.
Konsistenz: derb.

Milz: geringgradige Schwellung mit deutlicher follikulärer Hyperplasie.

Knochenmark: gallertige Atrophie des Femurmarkes; Sternalmark braunrot.

Lunge: unregelmäßige, bis 1 cm breite, grau-weißmarkige Manschetten entlang der Gefäße und Bronchien des linken Hauptlappens. Diffuse grau-weiß markige Verdichtung der Spitze des

- - -

rechten Spitzenlappens; gleichzeitig Verwachsung mit der Pleura costalis. Zahlreiche Lungenvormbrutknoten sowie einzelne mit grünem Eiter gefüllte erbsengroße Abszesse an den dorsalen Rändern der Hauptlappen.

Labmagen: mäßige Schwellung der Plicae spirales.

Leber: ein ca. 6 x 3 cm großer Abszess mit lamellär geschichtetem, teilweise verkalktem, grüngelbem Inhalt im linken Lappen.

Pathologisch-histologischer Befund:

In allen Lymphknoten besteht eine, mit dem Verlust des typischen Strukturbildes einhergehende massive Durchsetzung mit Rundzellen. Diese sind in Überwiegender Anzahl verhältnismäßig groß mit sehr großen dunklen Kernen und nur wenig Zytoplasma. Die ziemlich dichten Zellkerne lassen mehrere, teilweise unscharf abgesetzte, ungleichmäßig verteilte Chromozentren erkennen. In besonders großen Zellkernen der Infiltrate sind gelegentlich sehr helle Kernregionen auszumachen, in keinem Fall sind jedoch Nukleoli sichtbar.

Milz: ebenfalls massive Infiltration mit Zellen des oben beschriebenen Typs. Die Milzstruktur ist nur mehr teilweise erhalten.

Lunge: im Interstitium der makroskopisch veränderten Teile sind gelegentlich kleine Infiltratherdchen derselben Art wie in den Lymphknoten zu sehen, außer einer geringgradigen, mehr diffusen Infiltration des interalveolären Bindegewebes. Insbesondere in Umgebung der Bronchien und der großen Gefäße massive, manschettentartige Lager von Rundzellinfiltraten. Auch dieser Zelltyp entspricht dem der Lymphknotenveränderungen.

Labmagen: geringgradige, diffuse Infiltrate in der Submucosa, gelegentlich größere Ansammlungen mit Infiltration der Propria. Zelltyp der Infiltrate wie oben beschrieben.

Bakteriologischer Befund:

Aus dem Leberabszess konnte *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoliert werden.

Gesamtdiagnose:

vorwiegend unreifzellige lymphatische Leukose

Differenzierung des Zellbildes:

Eine Methylgrün-Thionin-Färbung wurde nicht angewendet.

e) Fall Nr. 1787/70

Schaf, weiblich, ca. 5 Jahre alt.

Seit Juni 1968 persistierende Lymphozytose. Die Lymphozytenzahl stieg seit November 1969 sprunghaft an und erreichte bis zur Tötung des Tieres im August 1970 einen Wert von 100% ($226000/\text{mm}^3$). Es konnte jedoch während der ganzen Krankheitsdauer keine Lymphknotenschwellung palpiert werden.

Das Tier wurde am 20.8.1970 in moribundem Zustand getötet und sofort entblutet. Klinisch zeigte sich eine hochgradige allgemeine Körperschwäche, starke Abmagerung sowie eine hochgradige Anämie.

Pathologisch-anatomischer Befund:

Lymphknoten: Kehlgangslymphknoten kirschgroß, Rachenlymphknoten walnußgroß, Buglymphknoten taubeneigroß.

Lymphknoten an der kleinen Kurvatur des Labmagens und Gekröslymphknoten bis walnußgroß, Mediastinallymphknoten mittelfingerstark. Bei diesen Lymphknoten ist die Struktur des Schnittbildes teils erhalten, teils leicht verwischt; die Konsistenz nicht verändert. Die übrigen Organ- und Körperlymphknoten er-

scheinen in ihrer Größe normal; die Struktur ist erhalten, die Konsistenz normal.

Milz: stark vergrößert (ca. 20 x 15 x 5 cm); Pulpa dunkelrot, von der Schnittfläche hervorquellend; Follikel undeutlich zu erkennen.

Knochenmark: im Femur gallertiges Fettmark, Sternmark braunrot.

Tonsillen: Die Bälghmandeln sind gut haselnußgroß.

Labmagen: in der Schleimhaut deutliche stecknadelkopfgroße, grauweiße Knötchen.

Darm: im Anfangsteil des Duodenum besteht auf ca. 15 cm Länge eine diffuse Verdickung der Schleimhaut. Im Dünndarm leichte Schwellung der Peyer'schen Platten.

Leber: leicht geschwollen, relativ deutliche Läppchenzeichnung, braunrote Farbe, Konsistenz normal.

Lunge: multiple Wurmknötchen, besonders an den dorsalen Rändern aller Lappen. Im rechten Spitzlappen befindet sich ein haselnußgroßer, braunroter, verdichteter Bezirk, in dessen Umgebung die Bronchialwände auf ca. 2 cm Länge leicht grauweiß-speckig verdickt sind.

Herz: in der Wand des rechten Vorhofs befindet sich ein stecknadelkopfgroßes grau-weißes Knötchen.

Übrige Organe: o.b.B.

Pathologisch-histologischer Befund:

Lymphknoten: in Bug-, Kehlgangs- und Mesenteriallymphknoten dichte Ansammlung von teilweise relativ großen rundlichen Zellen, überwiegend unter Verlust der normalen Lymphknotenstruktur. Die Zellen besitzen nur einen kleinen, leicht eosinophilen Zytoplasmasaum, die Kerne sind ziemlich kompakt mit zahlreichen, unregelmäs-

sig verteilten Chromatinschollen. In den Infiltratherden sind außerdem häufig Zellen mit kleinen, stark pyknotischen Kernen anzutreffen.

Milz und Tonsillen: vorwiegend diffuse Infiltration mit Zellen, die denen entsprechen, welche als Lymphknoteninfiltrate beschrieben wurden.

Labmagen und Darm: im Bereich der makroskopisch veränderten Bereiche starke Durchsetzung der Submukosa und teilweise auch der Propria mit Zellen desselben Typs wie die in den Lymphknoten beschriebenen.

Leber: starke periportale Infiltrate mit Zellen des oben beschriebenen Typs, die häufig untereinander konfluieren, teilweise mit Zerstörung der Leberstruktur.

Nieren: im Bereich der Papillen kleinere lockere Infiltrate. Diese Zellen entsprechen denen, die in den Lymphknoten beobachtet wurden.

Uterus: geringgradig streifenförmige Infiltrate, hauptsächlich in der Submucosa mit Zellen desselben Aussehens wie in den Lymphknoten.

quergestr.Muskulatur: spärlich Infiltrate mit Zellen des oben beschriebenen Typs im intermuskulären Bindegewebe.

Haut: sehr dichte Infiltrate mit entsprechenden Zellen wie in den Lymphknoten, in der Subkutis, Dermis und Epidermis.

Herz: Knötchen aus der Vorhofwand: dichte Infiltrate mit Zellen desselben Aussehens wie die in den Lymphknoten beschriebenen.

Lunge: im Spitzenlappen dichte Infiltration mit Zellen des oben beschriebenen Typs, teilweise unter Strukturverlust der Lunge.

Gesamtdiagnose:

vorwiegend reifzellige lymphatische Leukose.

Differenzierung des Zellbildes (Abklatschpräparat):

Unter 500 ausgezählten Zellen befinden sich 468 Zellen (= 93,6%) mit relativ kleinen, dichten, runden Kernen und schmalem pyroninophilen Saum (Lymphozyten); 18 Zellen (= 3,6%) zeichnen sich durch größere, spindelförmige Kerne und durch das völlige Fehlen einer Eryoninophilie aus (Retikulumzellen). Weitere 14 Zellen (= 2,8%) besitzen einen relativ großen, unregelmäßig geformten Kern und einen deutlichen pyroninophilen Plasmasaum (Lymphoblasten).

II. MIKROSPEKTROPHOTOMETRISCHE ERGEBNISSE

(2.1) Gesamt-DNS-Gehalt

Sowohl von den Leukosezellen als auch von den normalen Lymphozyten gelangt je eine Population von ca. 100 Zellen zur Auswertung (Abb. 3).

a) Normale Lymphozyten

Das Verteilungsdiagramm der Gesamtwerte zeigt eine deutliche Gruppierung um den Wert von 48,3 AE. Dieser dürfte mit dem Durchschnittswert der G_1 -Population identifizierbar sein.

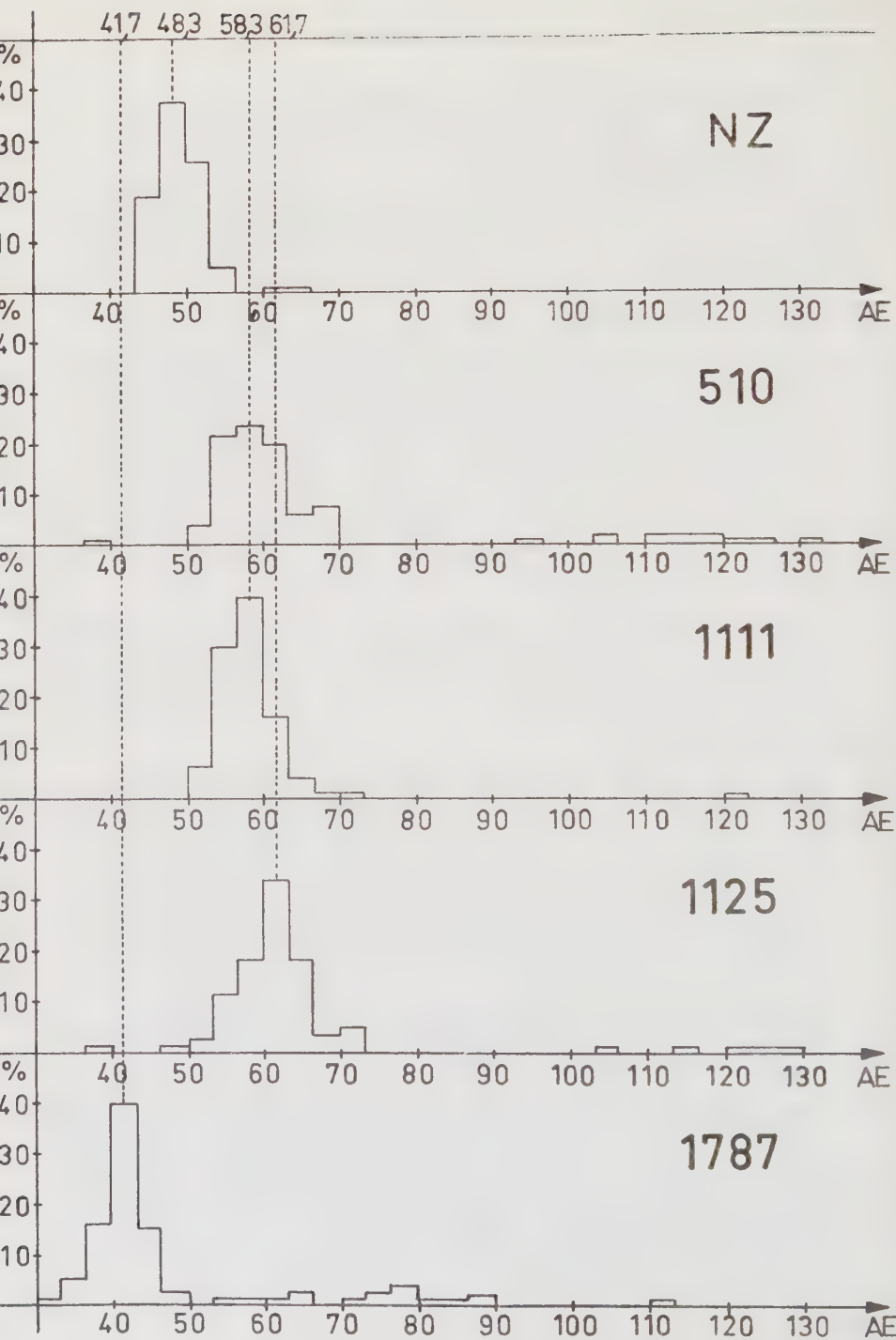
Ein weiterer Teil (2%) der Lymphozytenpopulation besitzt Gesamtwerte zwischen 60 und ca. 67 AE und ist vom Hauptgipfel abgesetzt. Bei diesen Zellen dürfte es sich um Zellen der S-Phase handeln.

Es sind keine Zellen vorhanden, die auf Grund ihres Gesamt-DNS-Gehalts als zur G_2 -Phase gehörend anzuschauen wären. Der Mittelwert der gemessenen Zellen liegt bei $49,24 \pm 3,46$.

b) Fall Nr. 510/70

Das Gesamt-DNS-Verteilungsmuster weist eine deutliche Streuung von < 40 AE bis > 130 AE auf. Ein deutlicher breiter Gipfel ist um den Wert von 58,3 AE gruppiert, der zu den hohen Werten hin nur langsam abfällt. Der Mittelwert der gemessenen Zellen liegt bei $66,34 \pm 18,76$ AE. Die gehäuften Werte von 58,3 AE dürften wohl als G_1 -Population anzusehen sein (Stammlinie 58,3 AE). Die Stammlinie liegt, im Vergleich zu den Normalzellen, im hyperdiploiden Bereich. Ein Wert < 40 AE entspricht dem Vorhandensein einer hypodiploiden Zelle.

Die etwas deutlichere Gruppierung von 6% der Werte zwischen 110 und 120 AE stellt die G_2 -Phase dar, zwischen G_1 und G_2 sind Messungen von S-Phasezellen (5%) verstreut. Einige, zwischen 120 und 130 AE vorkommende Meßwerte (3%) dürften von hypertetraploiden Zellen stammen.



c) Fall Nr. 1111/70

Das Verteilungsdiagramm der Gesamt-DNS-Werte weist eine sehr deutliche Gruppierung der Meßergebnisse um einen Gipfelwert von 58,3 AE auf. Auch in diesem Fall ist eine allmähliche Abstufung zu den höheren Werten zu erkennen.

Einige wenige Meßergebnisse gruppieren sich um 120-124 AE. Der Mittelwert der gesamten Population liegt bei $58,78 \pm 7,3$ AE. Der Wert von 58,3 AE dürfte die Stammlinie dieses Tumors sein und stimmt mit Fall Nr. 510 überein. Durch das direkte Anschließen der S-Phasenwerte an den G_1 -Bereich entsteht das langsame Abfallen der Gipfelbildung nach rechts.

Der Wert zwischen 120 und 124 AE ist bereits als hyper-tetraploid anzusehen, jedoch ist die Anzahl dieser Meßergebnisse (1%) zu gering, um als signifikant gelten zu dürfen.

d) Fall Nr. 1125/70

Das Gesamt-DNS-Verteilungsmuster zeigt eine starke Streuung von < 40 AE bis 130 AE, mit einem sehr deutlichen Gipfel bei 61,7 AE. Der Mittelwert der gemessenen Zellen liegt bei $63,96 \pm 13,9$ AE. Letzterer Wert dürfte mit dem Durchschnittswert der G_1 -Population identifizierbar sein (Stammlinie) und liegt somit weit im hyperdiploiden Bereich. Außer einem Meßwert, der einer auch gegenüber den normalen Lymphozyten hypodiploiden Zelle entsprechen würde, sind nur einige S-Zellen vorhanden (7%), sowie einige im Bereich von 120 - 130 AE rangierende Werte (3%), welche die G_2 -Phase repräsentieren dürften.

e) Fall Nr. 1787/70

Dieser Leukosefall zeichnet sich im Gesamt-DNS-Verteilungsdiagramm durch einen sehr deutlichen Gipfel bei 41,7 AE aus, durch eine breite, sehr flache Anhäufung von 9% der Meßwerte zwischen 70 und 90 AE, sowie durch 6% der

Werte zwischen 50 und 70 AE und einem Wert zwischen 110 und 115 AE. Mittelwert $47,7 \pm 15,1$ AE.

Die Gesamt-DNS-Werte um 41,7 AE dürften mit der G_1 -Population identifizierbar sein. Demzufolge besitzt dieser Fall eine hypodiploide Stammlinie. Bei den Werten zwischen 50 und 70 AE sind die Zellen der S-Phase, bei denen zwischen 70 und 90 AE die Zellen der G_2 -Phase enthalten. Das Meßergebnis um 112 AE kann mit einer hypertetraploiden Zelle identifiziert werden.

(2.2) Einzelpunkt-Mikrospektrophotometrie

a) Ermittlung des Gesamt-DNS-Gehaltes (siehe Tabelle 4)

Normale Lymphozyten:

Bei den 22 ausgemessenen Zellkernen rangieren die Gesamt-DNS-Werte zwischen 36,17 und 48,28 AE. Als repräsentativ für die G_1 -Phase werden 16 Zellen ausgewählt, deren Gesamt-DNS-Feulgenwerte zwischen 40,52 und 45,22 streuen ($\bar{x} = 42,89$).

Legt man der Gesamtpopulation einen mittleren G_1 -Wert von 48,3 AE zugrunde (siehe B 1), so ergibt sich für die G_1 -Werte der oben genannten 16 Repräsentativfälle im Mittel eine Differenz von 12,9%. (Erklärung später)

Fall Nr. 510/70

Es liegen die Ergebnisse von 23 punktweise ausgemessenen Zellkernen vor. Die Gesamt-DNS-Feulgenwerte streuen zwischen 50,56 AE und 67,71 AE.

Zur engeren Auswertung wurden 17 Zellkerne ausgewählt, deren Werte zwischen 54,89 und 63,31 AE schwanken. Mit einem Mittelwert von 58,70 AE entsprechen diese Kerne somit ziemlich genau dem G_1 -Mittelwert der Gesamtpopulation (58,30 AE).

Fall Nr. 1111/70

Insgesamt wurden 24 Zellkerne punktweise ausgemessen. Zwei Kerne mit niedrigem Gesamt-DNS-Gehalt (32,06 AE und 43,64 AE) werden nicht näher ausgewertet. Die restlichen 22 Zellkerne besitzen Gesamt-DNS-Feulgenwerte zwischen 49,70 AE und 59,78 AE. Mit einem Mittelwert von 55,23 AE liegen diese Kerne um 5,5% unter dem Durchschnittswert der G_1 -Zellen (Stammlinie = 58,3 AE) der Gesamtpopulation.

Fall Nr. 1125/70

Es wurden 20 Zellkerne ausgemessen. Die aus dem Einzel-

	NZ	510	1111	1125	1787
1	36,17	50,56	32,06	33,49	23,51
2	40,52	52,23	33,61	44,51	23,5
3	41,08	53,41	49,7	49,8	30,65
4	41,63	54,89	51,45	57,43	30,77
5	41,89	54,95	51,86	58,04	31,72
6	42,16	55,1	52,5	64,24	33,34
7	42,71	55,52	53,01	64,72	34,1
8	42,77	56,21	53,2	65,02	34,16
9	42,9	57,66	53,33	65,64	34,71
10	43,25	58,32	53,34	66,38	35,7
11	43,35	58,64	53,61	66,99	35,35
12	43,38	58,68	54,29	67,96	36,32
13	43,41	58,7	54,83	83,55	37
14	43,55	60,4	54,89	101,66	38,08
15	43,96	60,52	56,27	101,83	38,88
16	44,46	60,53	56,6	102,59	39,56
17	45,22	60,86	56,67	105,08	39,63
18	47,1	61,41	57,17	122,34	40,25
19	47,33	62,32	57,52	125,97	45,45
20	48,07	63,31	58,09	127,59	48,6
21	48,25	66,68	58,6	—	61,72
22	48,23	66,9	58,73	—	64,07
23	—	67,71	59,67	—	68,72
24	—	—	59,78	—	74,64
25	—	—	—	—	77,4
26	—	—	—	—	84,21
27	—	—	—	—	91,64

Abb. 4 Gesamt-DNS-Werte, errechnet nach den Ergebnissen der Einzelpunkt-Mikrospektrophotometrie.

messungen ermittelten Gesamt-DNS-Werte streuen zwischen 33,5 AE und 127,6 AE mit einer deutlichen Häufung zwischen 57,5 und 68,0 AE (9 Werte). Der Mittelwert dieses letztgenannten Bereiches liegt mit 64,04 AE um 3,8% höher als der vergleichbare Mittelwert der gesamten G_1 -Population (61,7 AE).

Fall Nr. 1787/70

Es wurden 27 Zellkerne ausgemessen. Die Feulgen-Gesamt-DNS-Werte liegen zwischen 28,51 AE und 91,64 AE verstreut. Unter diesen ist der Bereich zwischen 33,3 AE und 40,2 AE gut abgrenzbar (13 Zellen). Der Mittelwert dieser Kerne liegt bei 36,73, somit um 13,5% unter dem G_1 -Mittelwert (41,7 AE) der Gesamtpopulation.

b) Niveauabgrenzungsbilder der Kernstruktur

Normale Lymphozyten: (Abb. 5)

Bei diesen Zellkernen wird der Strukturtyp insbesondere vom Eindruck eines kompakten Kernaufbaus bestimmt. Dies wird außerdem durch die relativ geringe Gesamtgröße dieser Kerne unterstrichen.

Das Niveauabgrenzungsbild liegt nahezu konzentrisch innerhalb der Kernrandkontur. Es wird im Ganzen von sehr hohen Absorptionswerten beherrscht. Durch das oben erläuterte Abgrenzungsverfahren ist das Kernfeld unregelmäßig in viele kleine Regionen aufgesplittert, deren Absorptionsniveaus nur wenig gegeneinander differieren. Auf Grund der vielfältigen Aufsplitterung des Gesamtbildes und der nur geringfügigen Abgrenzbarkeit der einzelnen Gebiete, kann, im Gegensatz zu den Tumorzellkernen, eine leicht erkennbare Gruppenbildung von prominierenden Bereichen zu bestimmten geometrischen Figuren nicht erfolgen.

Fall Nr. 510/70 (Abb. 6 und 7)

Die Zellkerne dieses Falles imponieren, ebenso wie die Zellkerne des leukosekranken Schafes Nr. 1125, durch ihre Größe und durch die lockere Strukturierung. Dieser Eindruck wird optisch dadurch bekräftigt, daß Absorptionswerte < 30 als "leere Felder" gegenüber schraffierten Bereichen (Werte zwischen 30 und 80) abgesetzt sind. Sowohl bei den Zellkernen des Falles Nr. 510 als auch bei denen des Falles Nr. 1125 sind dadurch 1 - 3, relativ große und gut abgegrenzte, nicht schraffierte Regionen zu erkennen. Sofern diese ziemlich nahe am Rand der abgegrenzten Kernstrukturen liegen, tragen sie zu einer unregelmäßig eingebuchteten und "ausgefranst" Kontur des Niveauabgrenzungsgebietes bei.

Als charakteristisch für die Kernstrukturen des Leukosefalles Nr. 510 gilt, daß dichtere Chromozentren sich

meist in nachbarlicher Lage zu den "hellen", unschraffierten Gebieten befinden. Dabei zeigt eine dieser dichten Regionen oft die Tendenz ziemlich weit randständig zwischen dem Gebiet der niedrigen Absorptionswerte und dem eigentlichen Kernrand lokalisiert zu sein (11 Zellen von Fall Nr. 51o).

Ein weiteres dichtes, oft größeres Gebiet steht ziemlich in zentraler Position des Zellkernes (1o Zellen des Falles Nr. 51o).

Meist findet sich noch ein drittes, relativ kleines, dichtes Zentrum in unregelmäßig winkliger Anordnung zu den ersten beiden und schließt so die Umrahmung des niederen Niveaubereiches ab (1o Zellen des Falles Nr. 51o).

Sind zwei oder gar drei "helle Regionen" innerhalb des Niveauabstufungsbereiches vorhanden (4 Zellen des Falles Nr. 51o), so sind entsprechend mehr Chromozentren zu finden, die wiederum eine ähnliche Lagebeziehung, wie oben geschildert, erkennen lassen. Jedoch wird nun durch die Vielzahl der dichten Kernregionen die Übersichtlichkeit des Gesamtbildes verwischt (Nr. 45, 124, 127, 128, 129, 13o). Es tritt ein reichlich versprengter Chromozentrentyp in Erscheinung, der die Abgrenzung insbesondere gegenüber den Zellkernen des Falles Nr. 1125 erschwert (siehe dort !).

Fall Nr. 1111/7o (Abb. 8)

Im Gegensatz zu den Zellkernen der Fälle Nr. 51o und Nr. 1125 weisen bei diesem Leukosefall die Kerne trotz ihrer mit Nr. 51o und Nr. 1125 vergleichbar ähnlichen Größe einen geschlossenen Eindruck des Niveauabgrenzungsbildes auf. Auch treten hier keine Regionen auf, die in ihren Absorptionswerten < 30 liegen (und somit als unschraffierte Gebiete zur Auflockerung des Bildes führen könnten). Eine Ausnahme von diesem allgemeinen Erscheinungsbild macht nur eine Zelle, die wegen ihres vielfältig eingebuchteten Niveauabgrenzungsbildes leicht mit den

Zellkernen des Falles Nr. 510 oder der Nr. 1125 verwechselt werden kann.

Als charakteristisch für die Tumorzellkerne des Falles Nr. 1111 kann angesehen werden, daß mindestens ein, meist jedoch zwei dichtere Gebiete auftreten, von denen das größere ziemlich zentral, das andere zwischen Kernrand und Zentrum gelegen ist (11 Zellen der Nr. 1111).

Zu diesen beiden Gebieten gesellt sich dann in weiteren 5 Zellkernen noch ein kleineres, dichtes Gebiet in ungefähr rechtwinkliger Anordnung zu den eben erwähnten größeren Zentren. Es können auch zwei kleinere Gebiete zu den beiden, größeren, oben beschriebenen Regionen hinzutreten, die nun alle ungefähr die Ecken einer Rautenform besetzen (3 Zellen der Nr. 1111).

Insgesamt ist auch bei diesem Leukosefall beachtenswert, daß sich im Gegensatz zu normalen Lymphozyten die dichten Regionen deutlich vom lockeren Chromatin abheben.

Fall Nr. 1125/70 (Abb. 9)

Ähnlich wie bei Fall Nr. 510 zählt zu den Charakteristika dieser Zellkerne, außer ihrer Größe, die lockere Anordnung der Chromatinmuster, was durch das Vorhandensein sog. "leerer Regionen" deutlich unterstrichen wird.

Besonders charakteristisch erscheint die starke Aufsplitterung in viele Niveaubereiche; dieser Eindruck wirkt dominierend über das gesamte Kernbild. Unter diesen vielen abgegrenzten Regionen befinden sich 4-6 kleinere, relativ gut abgesetzte, dichte Zentren, die nahezu regelmäßig verstreut liegen. Sie zeigen in ihrer gegenseitigen Anordnung keine besondere Gesetzmäßigkeit, vereinzelt läßt sich eine Tendenz zur ringförmigen Anordnung vermuten.

Fall Nr. 1787/70 (Abb. 10 und 11)

Die Größe der Kerne, sowie das kompakte Aussehen der Kernstruktur, ist vergleichbar mit dem Bild, das bei den normalen Lymphozyten gewonnen wurde.

Teilweise (6 Zellen der Nr. 1787) ist eine deutliche Aufsplitterung des Chromatins in zahlreiche Felder zu verzeichnen. Diese besitzen jedoch, im Gegensatz zu den normalen Lymphozyten, eine deutlichere Abstufung gegeneinander. Es sind 1 - 3 prominierende Zentren vorhanden, die etwa V-förmig zueinander angeordnet liegen, wobei die Spitze des " V " etwas exzentrische Lage einnimmt. Diese Beurteilung wird jedoch dadurch erschwert, daß im allgemeinen bei den höchsten Gebieten eine Tendenz zur Konfluation zu verzeichnen ist.

NZ

(16)

AE: 44,46

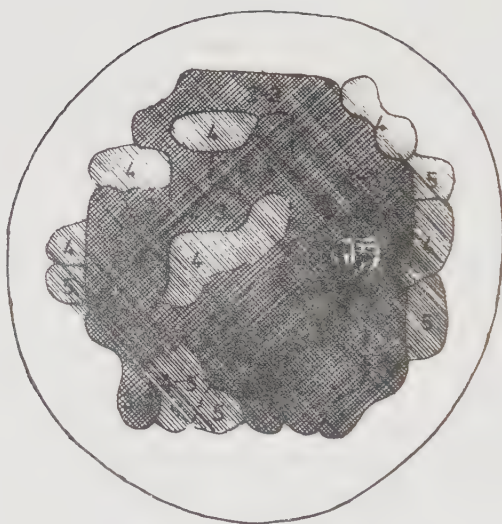


Abb. 5 Niveauabgrenzungsbilder typischer Zellkerne
normaler Lymphozyten .

NZ

(2)

AE: 40,52

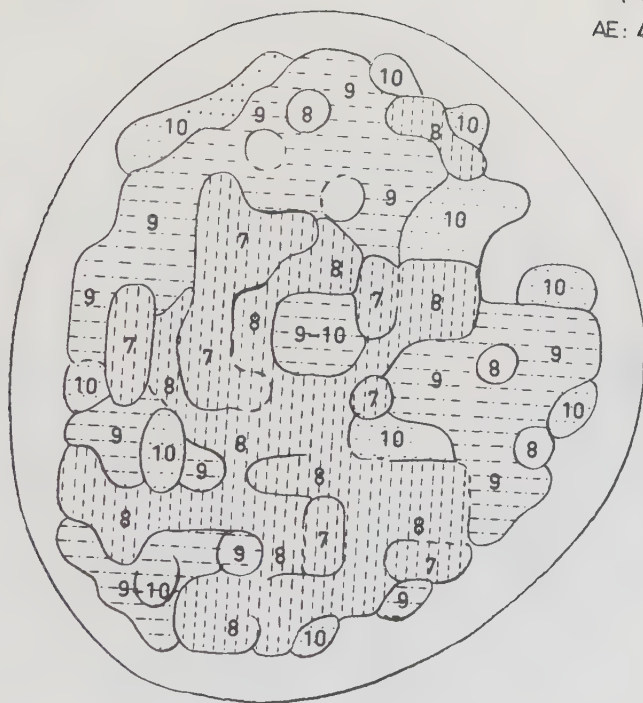


Abb. 5 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
der normalen Lymphozyten .

N Z
(17)

AE: 45,22

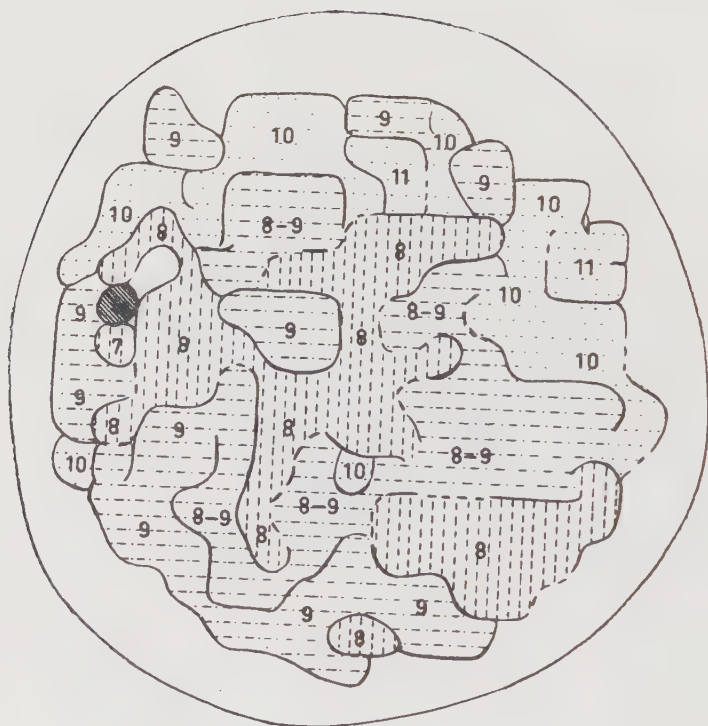


Abb. 5 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
der normalen Lymphozyten .

510

(11)

AE: 58,64

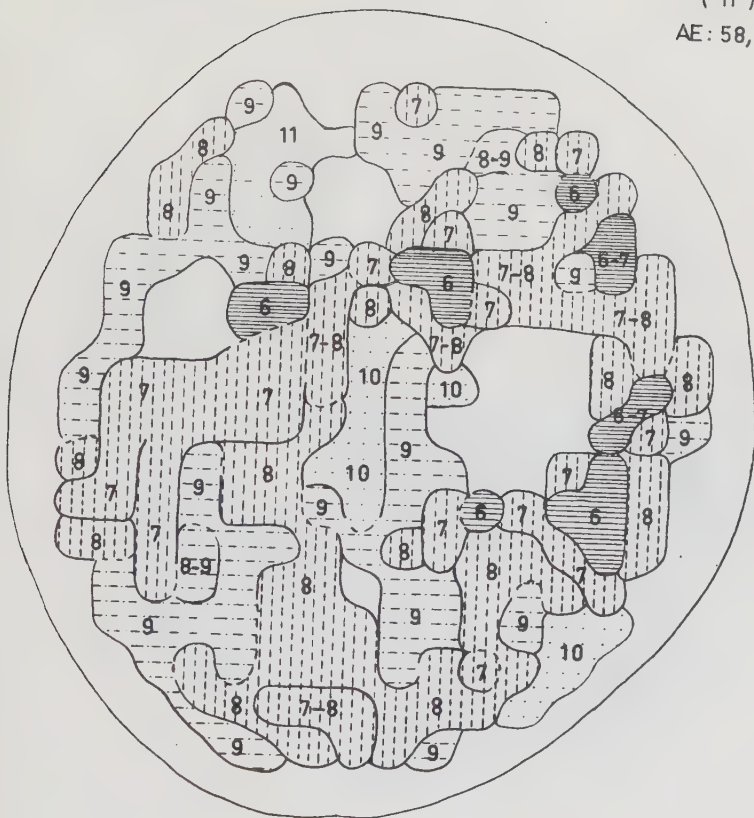


Abb. 6 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 510

510

(18)

AE: 61,41

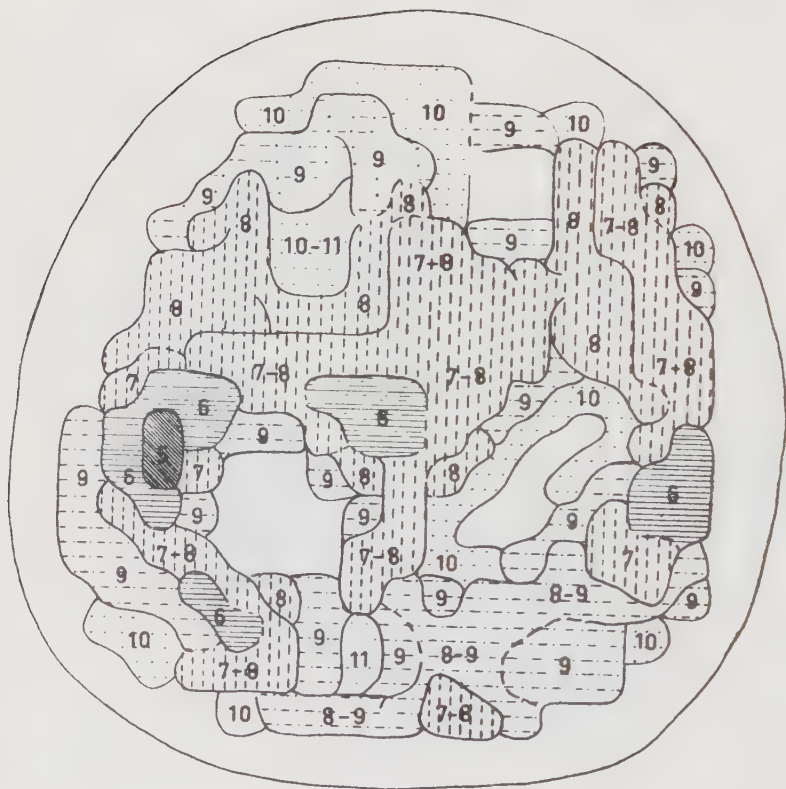


Abb. 6 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 510

510

(19)

AE: 62,32

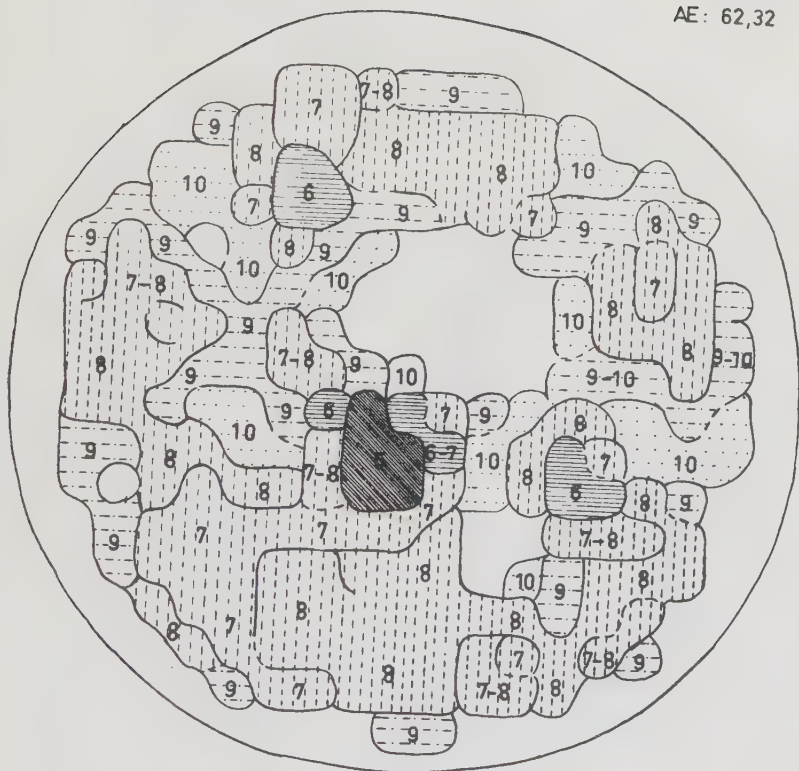


Abb. 6 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 510

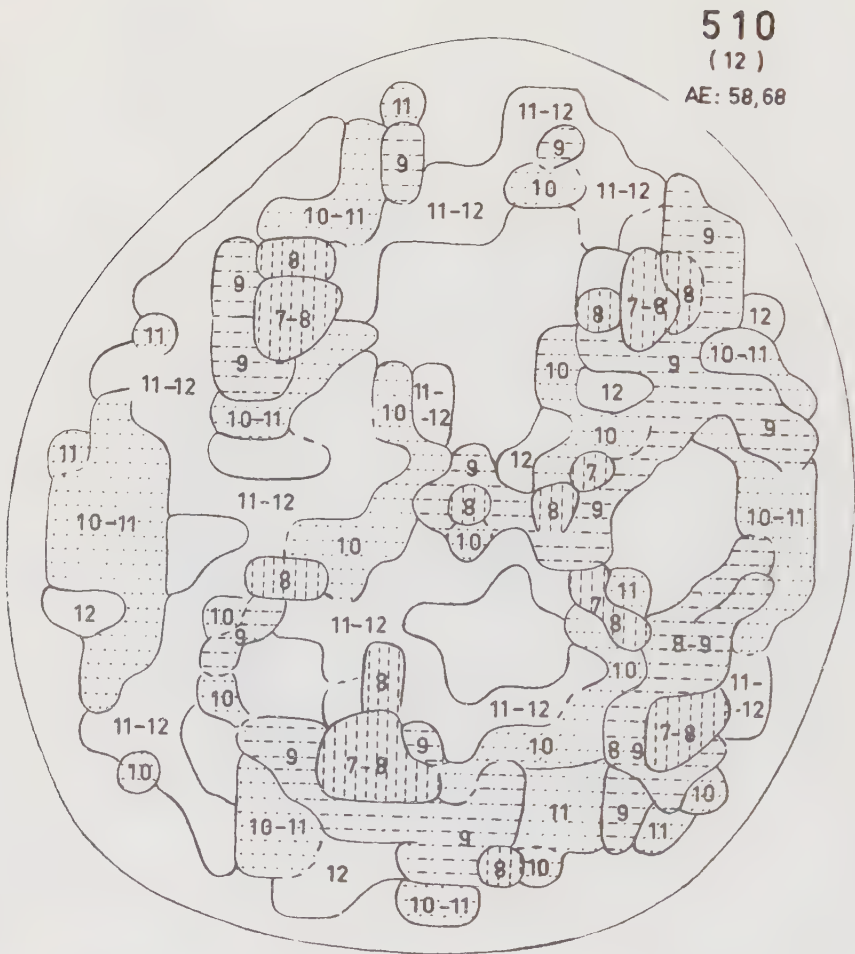


Abb. 7 Niveauabgrenzungsbild eines atypischen Zellkerns
von Fall Nr. 510

510

(17)

AE: 60,86

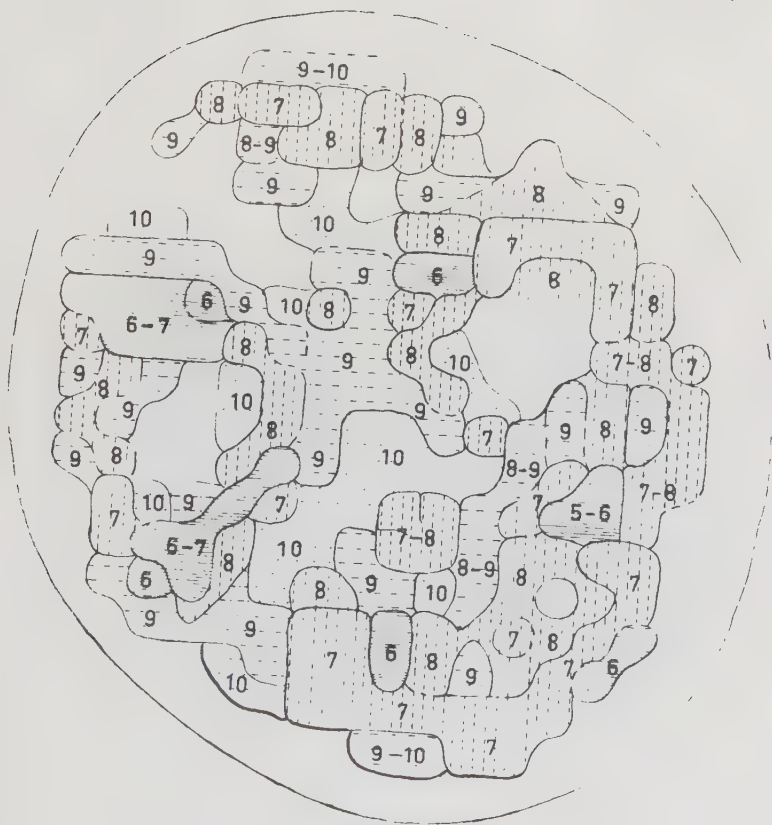


Abb. 7 Niveauabgrenzungsbild eines atypischen Zellkerns
von Fall Nr. 510

1111

(8)

AE: 53,20

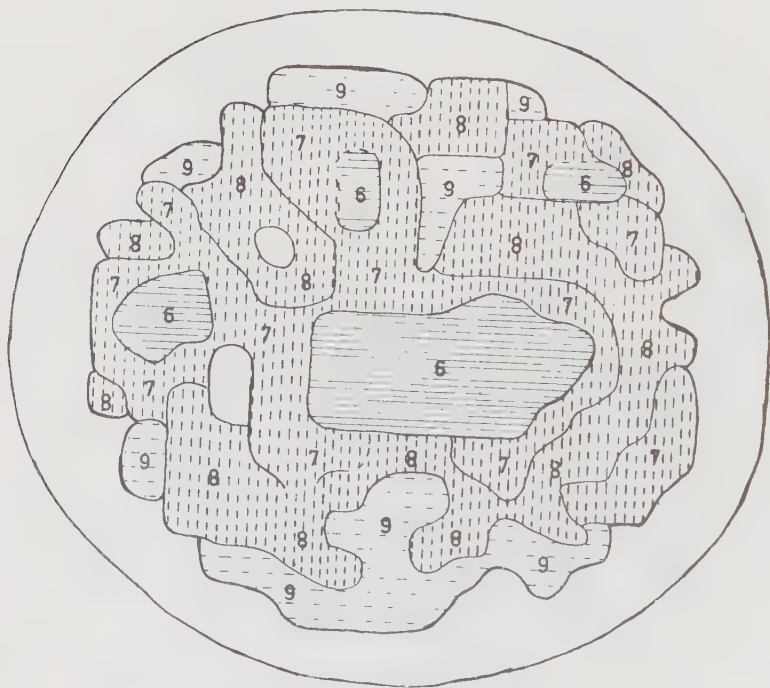


Abb. 8 Niveaubegrenzungs bild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1111

1111

(10)

AE: 53,34

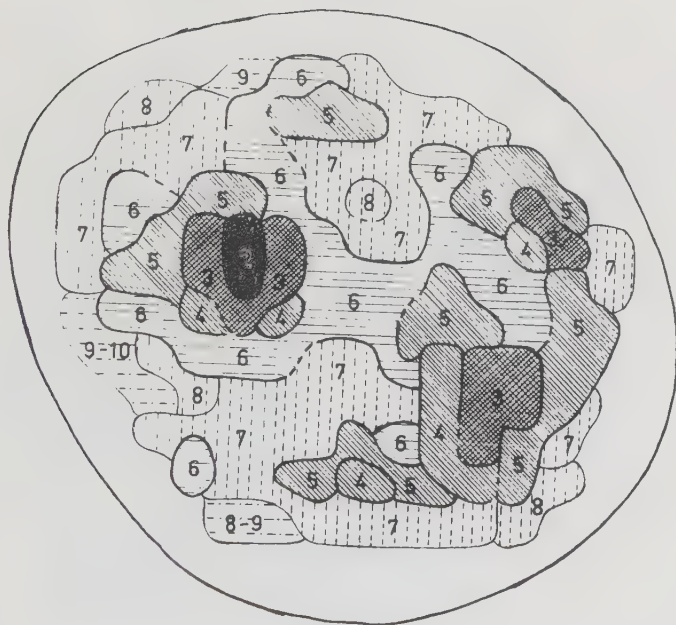


Abb. 8 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1111

1111
(13)

AE: 54,83

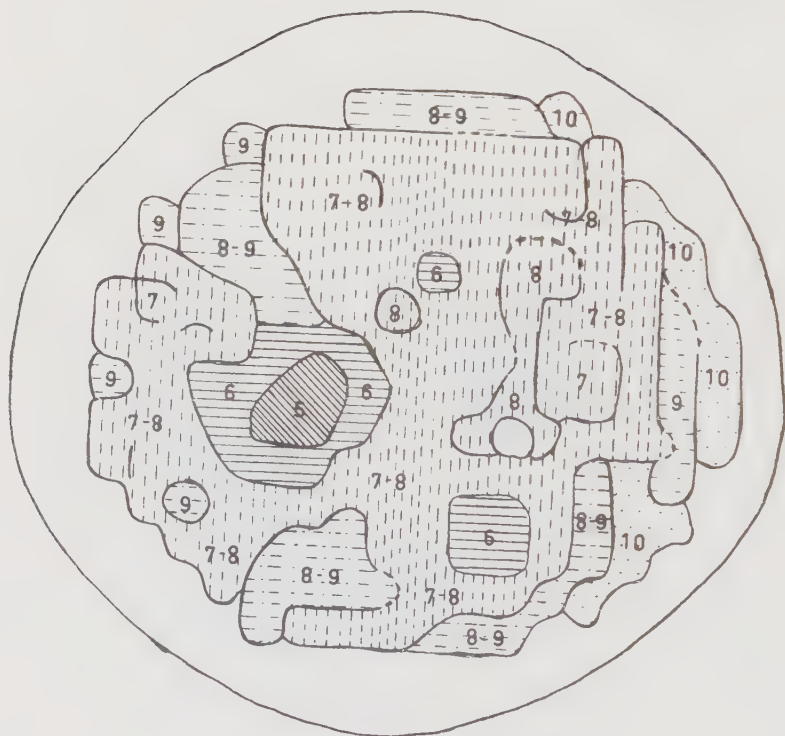


Abb. 8 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1111

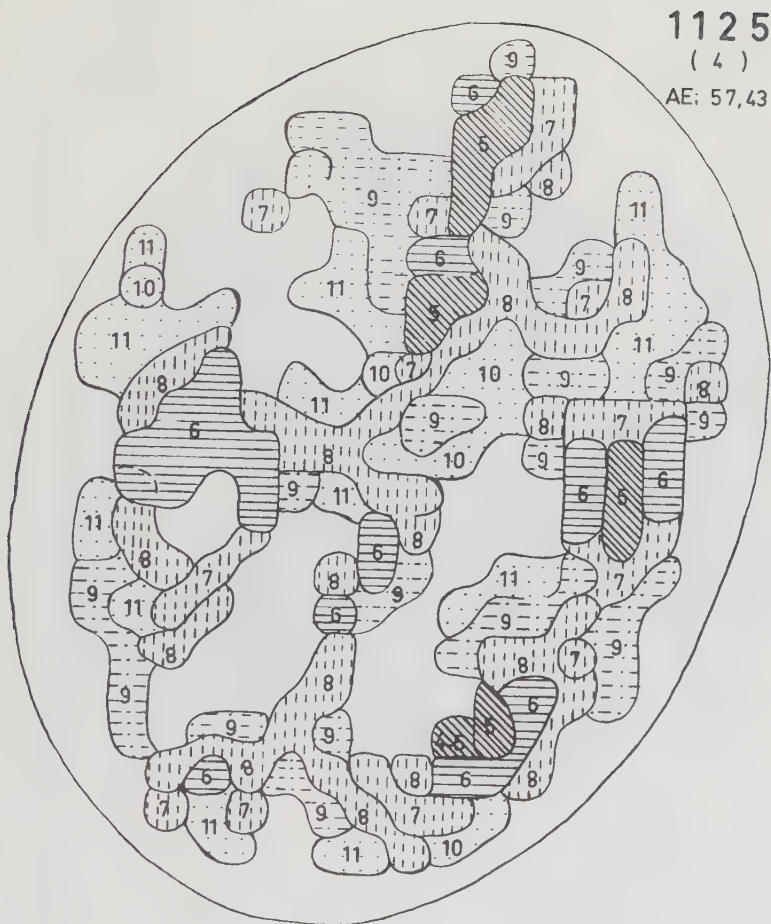


Abb. 9 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1125

1125

(11)

AE: 66,99

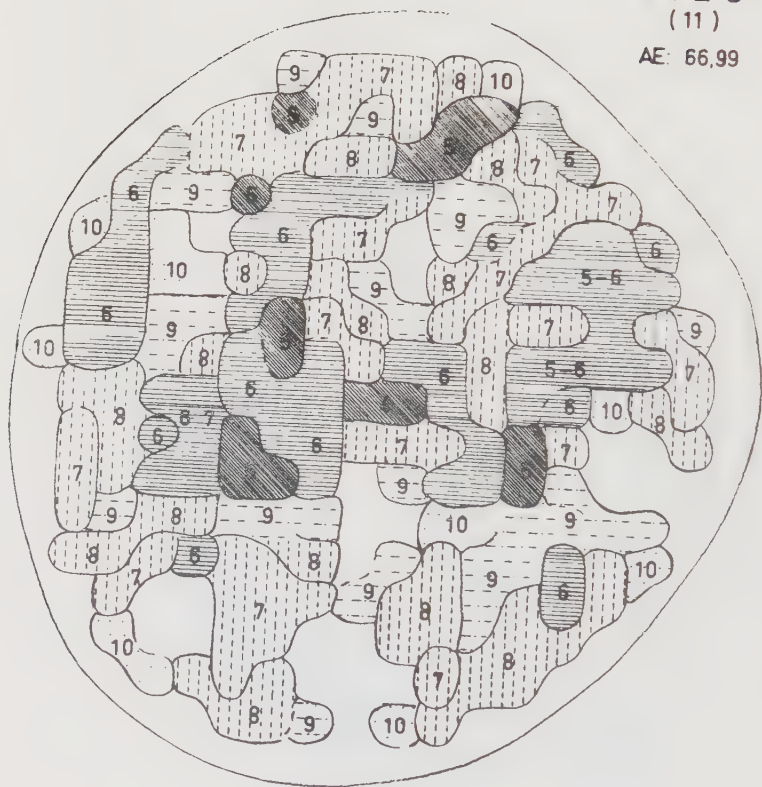


Abb. 9 Niveaubegrenzungs-bild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1125

1125

(12)

AE: 67,96

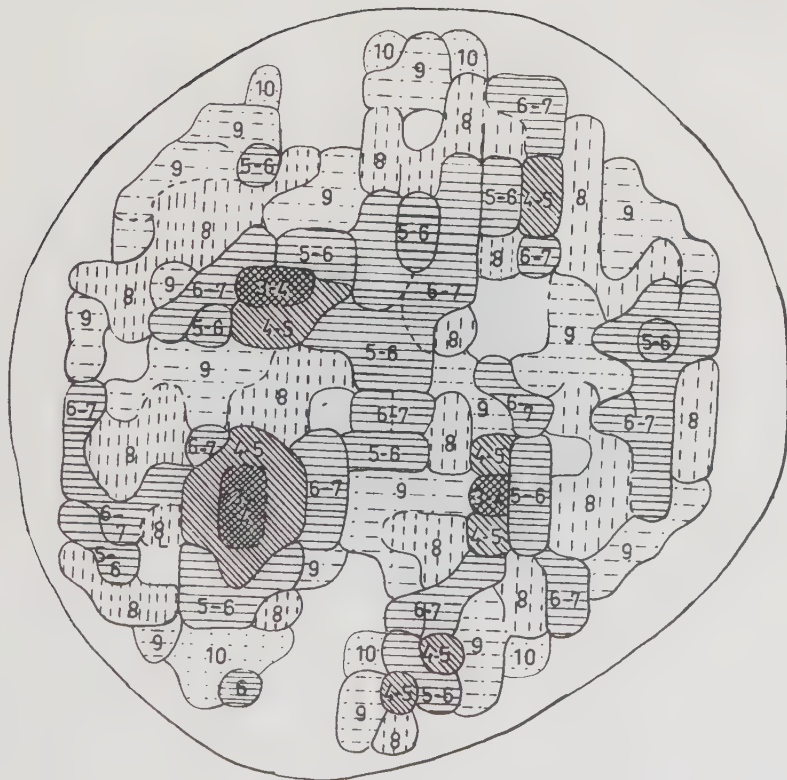


Abb. 9 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1125

1787

(11)

AE: 35,85

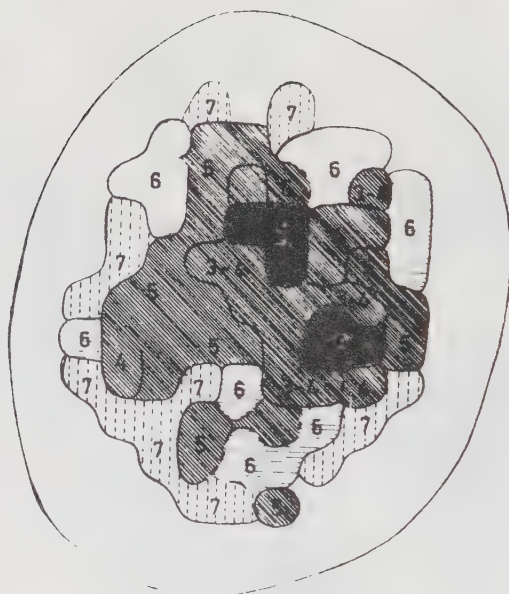


Abb. 10 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1787

1787

(12)

AE: 36,32

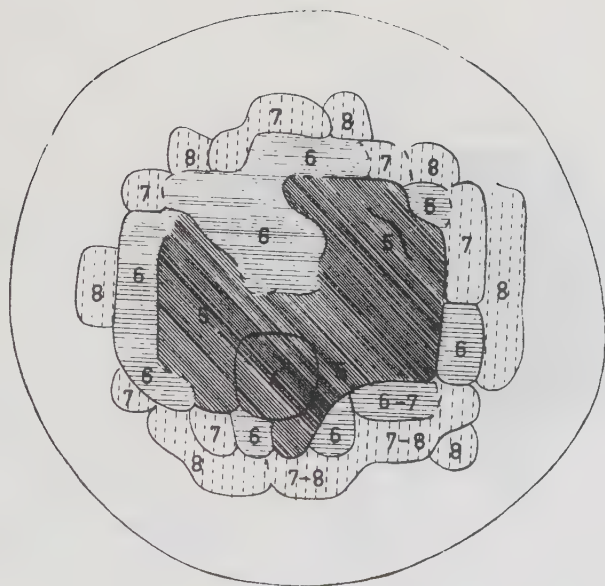


Abb. 10 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1787

1787

(14)

AE: 38,08

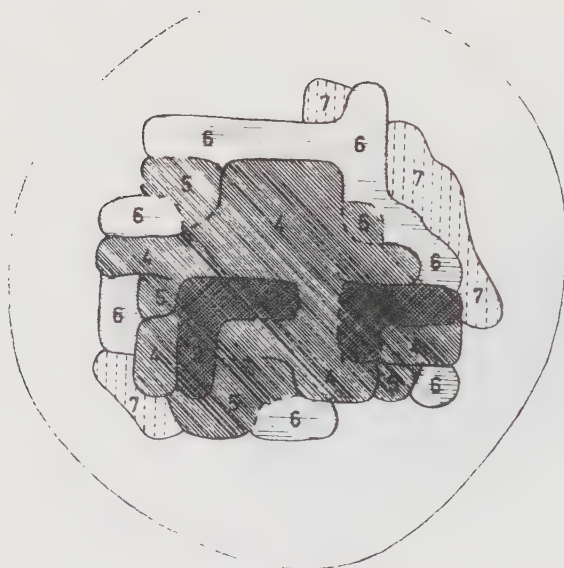


Abb. 11 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1787

1787

(8)

AE: 34,16

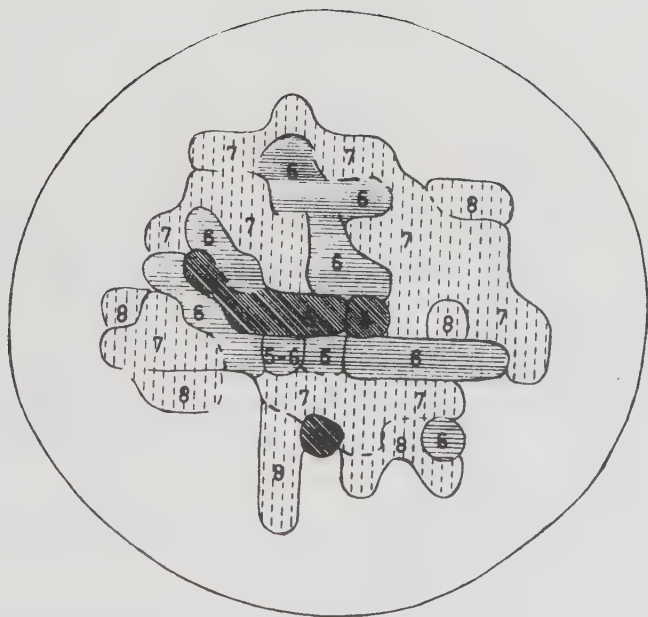


Abb. 11 Niveauabgrenzungsbild eines typischen Zellkerns
von Fall Nr. 1787

c) Absorptionshäufigkeitsverteilungskurven

Abb. 1 zeigt die mittlere Häufigkeit aller Absorptionswerte der G₁-Phasezellen, sowohl der normalen Lymphozyten, als auch der Tumorzellen. Das gezeigte Diagramm ist insofern nicht ganz wirklichkeitsgetreu, als die einzelnen Absorptionswerte nicht gesondert aufgeführt werden, sondern stets nur das Mittel aus jeweils 5 aufeinanderfolgenden Absorptionen. Die dadurch gewonnene Übersichtlichkeit ermöglicht erst, daß alle Absorptionsverteilungskurven in einem Diagramm aufgeführt werden.

Bei der gewählten Darstellungsform der Absorptionsverteilungskurven erkennt man bei den normalen Lymphozyten nahezu einen Gauß'schen Verteilungstyp mit einem deutlichen Gipfel bei Absorptionswerten von 37 - 40, sowie einem zweiten, kleinen Gipfel beim Wert von 70.

Die Maximalwerte der für die Leukosefälle aufgestellten Verteilungskurven liegen demhingegen deutlich in höheren Absorptionsbereichen: bei Fall Nr. 510 ist ein deutlicher Gipfel bei A = 43 ausgebildet, mit einer bedeutend breiteren Streuung als bei normalen Lymphozyten. Dadurch, daß bei letzteren die Verteilungskurve ziemlich steil ansteigt und bedeutend langsamer abfällt, scheinen insbesondere die unter 40 liegenden Absorptionsbereiche bei Fall Nr. 510 betont.

Fall Nr. 1111 zeigt einen ziemlich ebenmäßigen Verteilungstyp mit einem deutlichen Gipfelplateau zwischen den Absorptionswerten 43-48.

Fall Nr. 1125 zeigt bis zum Absorptionswert von 43 einen sehr ähnlichen Verlauf der Verteilungskurve wie die des Falles Nr. 1111. Auffällig ist jedoch das Auftreten zweier Häufigkeitsgipfel, der erste beim Wert von 43, der zweite bei 53, mit der dazwischenliegenden Kurveninflexion um den Absorptionswert 48. Durch den zweiten Gipfelwert besitzt dieser Fall eine besonders deutliche Streuung im Bereich hoher Absorptionswerte.

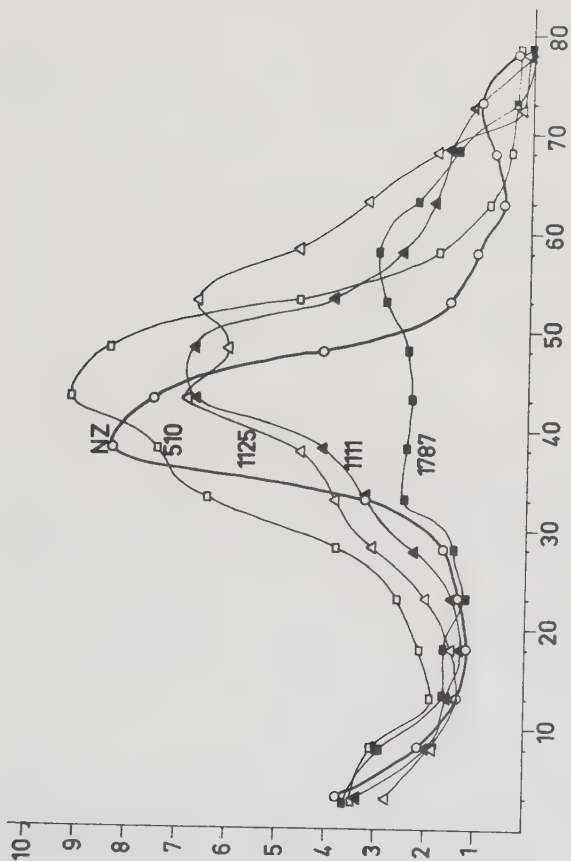


Abb. 12 Absorptionshäufigkeitsverteilungskurven

Der Fall Nr. 1787 besitzt schließlich den eigenartigsten Verlauf der Absorptionsverteilungskurve. Nach einem raschen Ansteigen der Häufigkeiten zwischen den Werten 28 - 33 bildet sich ein relativ niedriges und breites Plateau aus, das erst bei einem Wert von 48 in einen erneuten, seichten Anstieg übergeht und schließlich beim Absorptionswert von 58 einen leichten Gipfel aufweist.

Die bei den 4 Tumorfällen und bei den normalen Lymphozyten verschiedene starke Ausprägung der Maximalwerte, verbunden mit der Steilheit der Kurven, ist auf die wegen der differierenden Kerngrößen unterschiedliche Anzahl an Meßpunkten zurückzuführen. Somit ist die von einer Absorptionsverteilungskurve eingeschlossene Fläche ein direktes Maß für die mittlere Kerngröße des betreffenden Falles.

Das zunächst nur aus dem Verlaufstyp der Kurven abzulesende Ergebnis, nämlich der Verschiebung der Absorptionswerte der Tumorzellen, verglichen mit den normalen Lymphozyten, zu höheren Werten hin, bedarf einer statistischen Absicherung. Dazu wurde eine sich aus den bisherigen Werten direkt ableitende Darstellungsform gewählt, nämlich die Absorptionsniveaukurven. Bei diesen tritt nicht, wie im eben gezeigten Diagramm die Kerngröße als Parameter auf, sondern nur der mittlere Gesamt-DNS-Gehalt (Näheres siehe: Diskussion).

d) Absorptionsniveaukurven

Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Kurvenformen der betreffenden G_1 -Populationen ist bei der Darstellungsweise der Abb. 13 nicht möglich, sondern erst nach Normierung der Koordinatenschnittpunkte (Abb. 14).

Die für die G_1 -Population der normalen Lymphozyten aufgestellte normierte Kurve zeigt bis zu einem Niveau von 37,5% aller Absorptionswerte einen ziemlich steilen Anstieg, der seine Fortsetzung in einem ziemlich flach ver-

laufenden Kurvenstück findet, um dann bei einem Absorptionsniveau von 62,5% in einen nahezu linearen Anstieg unter einem Winkel von 45° überzugehen.

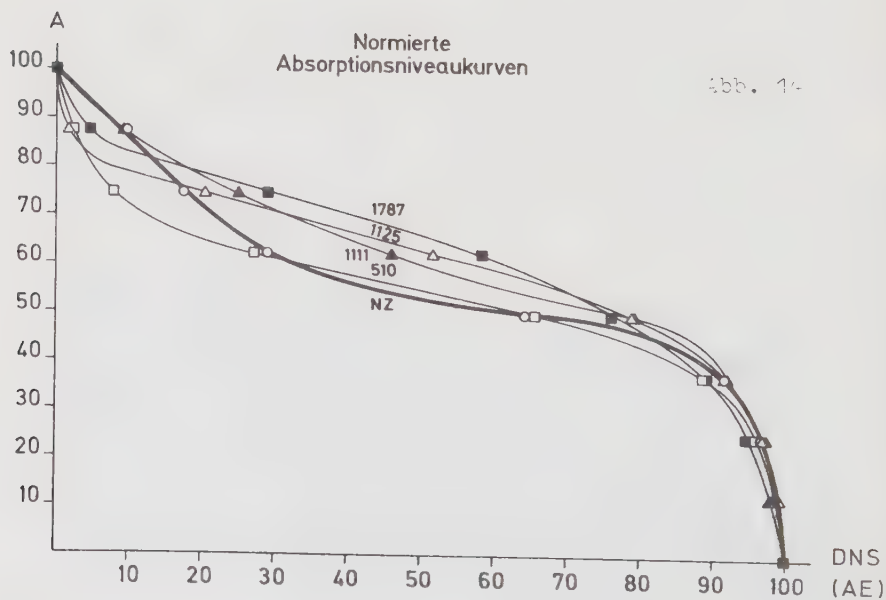
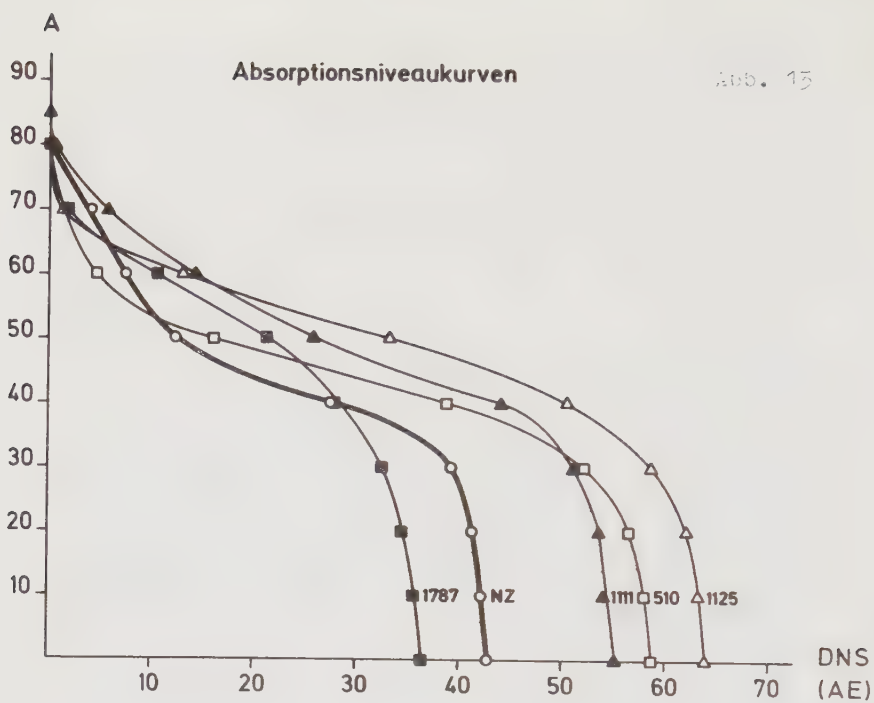
Aus diesem Kurvenverlauf ist zu erkennen, daß ungefähr 60% des mittleren Gesamt-DNS-Gehalts auf den Absorptionswerten des Niveaubereiches zwischen 37,5 und 62,5% basiert. Dieser demnach nur zu 25% am gesamten Absorptionsspektrum teilhabende Bereich rangiert in einem Diagramm mit Darstellung der absoluten Werte (Abb. 14) zwischen den absoluten Absorptionswerten 30 - 50.

Weitere 30% des mittleren Gesamt-DNS-Gehaltes verteilen sich auf den Bereich zwischen 62,5 und 100% (Anteil an der gesamten Absorptionsbreite = 37,5%; entspricht dem absoluten Bereich zwischen 50 und 80). Die restlichen 10% des Gesamt-DNS-Gehaltes entfallen auf die Absorptionswerte zwischen 1 und 30 (= 37,5% der gesamten Absorptionsbreite).

Die normierte Kurve für Nr. 510 zeigt einen über weite Teile nahezu identischen Verlauf wie die Kurve der normalen Lymphozyten: während im Anfangsteil noch ein etwas flacherer Anstieg als bei NZ zu verzeichnen ist, sind beide Kurven (NZ und 510) zwischen 37,5 und 62,5% nahezu deckungsgleich. Ab diesem letzteren Niveau nimmt Nr. 510 jedoch einen nahezu hyperboloiden Verlauf, im Gegensatz zu dem fast linearen Anstieg der NZ-Kurve.

Man kann diesem Kurvenbild entnehmen, daß hier wiederum, wie bei NZ, 60% der Gesamt-DNS auf den Bereich zwischen 37,5 und 62,5% entfallen (= 30-50 absoluter Absorption). Im Folgenden jedoch kommt der Bereich zwischen 62,5 und 75% (= Werte zwischen 50 und 60) mit einem Anteil von rund 20% des Gesamt-DNS-Gehaltes ungefähr doppelt so stark zum Tragen wie bei NZ.

Die Abweichung des Kurvenlaufes von Nr. 510 besitzt gegenüber der NZ-Kurve, bis auf die Bereiche zwischen



$A = 1 - 10$ (= 0-12,5%) sowie $A = 60 - 70$ (= 75-87,5%), eine positive Signifikanz im Student' t-Test (siehe Tabelle 15).

Die entsprechende normierte Kurve für Nr. 1111 zeigt bei den niedrigen Niveaus einen sehr starken Anstieg und verläuft unter deutlicher Divergenz zur NZ-Kurve mit nahezu gleichbleibender Steilheit auf den Ordinaten-schnittpunkt zu.

Dies bedeutet, daß ungefähr in den ersten zwei Dritteln der Kurve die Abnahme des Gesamt-DNS-Gehaltes bedeutend geringer ist als bei NZ oder Nr. 510. So besteht bei einem Niveau von 62,5% erst eine Verringerung des Gesamt-DNS-Gehaltes um 53,5% gegenüber dem Ausgangswert, während die NZ und 510-Kurven bei gleich hoher Niveautrennung bereits eine > 70%ige Gesamtwertabnahme erkennen lassen. Somit ist der Bereich zwischen 62,5 und 100% (= 37,5% der gesamten Absorptionsbreite), welcher den absoluten Absorptionswerten zwischen 50 und 85 entspricht, zu 46,5% am Gesamt-DNS-Gehalt beteiligt.

In den Bereichen 31-40 (= 37,5% - 50%) sowie zwischen 51 und 70 (= 62,5 - 87,5%) besteht eine positive Signifikanz zwischen den Diagrammwerten von 1111 zu den normalen Lymphozyten (NZ).

Die normierte Absorptionsniveaukurve für den Fall Nr. 1125 besitzt, verglichen mit den anderen Kurven zwischen 0 und 37,5%, den steilsten Anstieg. Der weitere Verlauf ist bis zum Niveauwert von 50% noch ziemlich steil. Erst ab diesem Bereich geht die Kurve in einen fast geradlinigen, flachen Verlauf über, der jedoch deutlich steiler ist als das vergleichbare flache Kurvenstück von NZ bzw. 510. Diese Verlaufsrichtung wird bis zur Niveautrennung von 87,5% beibehalten (1,6% des Gesamt-DNS-Gehaltes), um dann in einen nahezu senkrechten Anstieg bis zum Ordinatenschnittpunkt überzugehen.

Abb. 15 t - Test (Leukosefälle gegenüber normale Lymphozyten). Erläuterung bei Abb. 16

A	NZ			510: NZ			1111: NZ			1125: NZ			1787: NZ		
	n	t	σ	n	t	f	σ	n	t	f	σ	n	t	f	σ
1-10	160 2,2334 5,8630	170 3,2331 4,2311	-	160 2,2334 5,8630	170 3,2331 4,2311	373 0,6334 5,4153	-	160 2,2334 5,8630	170 3,2331 4,2311	373 0,6334 5,4153	-	160 2,2334 5,8630	170 3,2331 4,2311	373 0,6334 5,4153	-
11-20	150 1,3396 2,7057	170 2,0547 3,5341	+	150 1,3396 2,7057	170 2,0547 3,5341	373 0,6334 5,4153	+	150 1,3396 2,7057	170 2,0547 3,5341	373 0,6334 5,4153	+	150 1,3396 2,7057	170 2,0547 3,5341	373 0,6334 5,4153	+
21-30	150 1,5472 3,2242	170 3,2412 11,5921	+	150 1,5472 3,2242	170 3,2412 11,5921	373 0,6334 5,4153	+	150 1,5472 3,2242	170 3,2412 11,5921	373 0,6334 5,4153	+	150 1,5472 3,2242	170 3,2412 11,5921	373 0,6334 5,4153	+
31-40	150 5,6346 38,7257	170 7,0412 30,4350	+	150 5,6346 38,7257	170 7,0412 30,4350	373 0,6334 5,4153	+	150 5,6346 38,7257	170 7,0412 30,4350	373 0,6334 5,4153	+	150 5,6346 38,7257	170 7,0412 30,4350	373 0,6334 5,4153	+
41-50	150 5,9052 29,0514	170 9,5291 21,2153	+	150 5,9052 29,0514	170 9,5291 21,2153	373 0,6334 5,4153	+	150 5,9052 29,0514	170 9,5291 21,2153	373 0,6334 5,4153	+	150 5,9052 29,0514	170 9,5291 21,2153	373 0,6334 5,4153	+
51-60	150 1,3734 6,1717	170 3,3353 5,3425	+	150 1,3734 6,1717	170 3,3353 5,3425	373 0,6334 5,4153	+	150 1,3734 6,1717	170 3,3353 5,3425	373 0,6334 5,4153	+	150 1,3734 6,1717	170 3,3353 5,3425	373 0,6334 5,4153	+
61-70	150 0,5367 2,5667	170 0,5382 3,7433	-	150 0,5367 2,5667	170 0,5382 3,7433	373 0,6334 5,4153	-	150 0,5367 2,5667	170 0,5382 3,7433	373 0,6334 5,4153	-	150 0,5367 2,5667	170 0,5382 3,7433	373 0,6334 5,4153	-
71-80	150 0,3173 0,3173	170 0,3173 0,3173	+	150 0,3173 0,3173	170 0,3173 0,3173	373 0,6334 5,4153	+	150 0,3173 0,3173	170 0,3173 0,3173	373 0,6334 5,4153	+	150 0,3173 0,3173	170 0,3173 0,3173	373 0,6334 5,4153	+

Dies besagt, daß der Gesamt-DNS-Gehalt bis zu einer Niveautrennung von 62,5% um weniger als 50% (48,4%) gegenüber dem Ausgangswert abgenommen hat. Demzufolge umfaßt der Niveaubereich von 62,5 - 87,5% (= 25% des Gesamtspektrums; absolute Werte zwischen 50 und 70) genau 50% (51,6 - 1,6%) des Gesamt-DNS-Gehaltes.

Dieser genannte Bereich von 51-80 (= 62,5 - 100%) ist als statistisch signifikant gegenüber dem entsprechenden Bereich der NZ-Kurve abgesichert (siehe Tab.15).

Bei der normierten Absorptionsniveaukurve des Falles Nr. 1787 läßt sich im Vergleich zu den anderen Kurven der relativ flachste Anstieg vermerken, der nun jedoch nicht, wie bei den anderen Verlaufstypen, ab einer Niveautrennung von 37,5 in einen m.o.w. deutlich abgesetzt flachen Teil übergeht. Der Kurvenanstieg verläuft hier bis zur Niveautrennung von 62,5 nahezu gleichförmig, unter starker Divergenz zur NZ-Kurve, aber auch zu den Kurven der anderen Leukosefälle. Ab dem letztgenannten Niveauwert erfolgt ein nahezu linearer Anstieg, parallel zum Verlauf der Kurve von Nr. 1125 in diesem Bereich. Ab der Niveaugrenze von 87,5% (4,63% des Gesamt-DNS-Gehalts) steigt die Kurve nochmal mit einer Steilheit von ca. 60° bis zum Ordinatenschnittpunkt an.

Der Gesamt-DNS-Gehalt erniedrigte sich bis zur Niveaugrenze von 62,5% nur um 41,6%. Somit umfaßt der Niveaubereich von 62,5% bis 87,5% (= 25% des Gesamtgebietes; absolute Werte zwischen 50 und 70) 53,76% des Gesamt-DNS-Gehaltes (58,39 - 4,63).

Die Absorptionsniveaukurve von Nr. 1787 ist ab dem Bereich von 30 (= 37,5%) statistisch signifikant von der Normalzellkurve unterschieden.

Vergleicht man die Kurven der einzelnen Leukosefälle untereinander hinsichtlich der statistischen Signifikanz ihrer Abgrenzbarkeit (siehe Tabelle 16), so zeigt 510 : 1111 über allen Bereichen mit Ausnahme zwischen

Abb. 16 t - Test (Abgrenzbarkeit der Leukosefälle untereinander)

A = Absorption t = t - Wert f = Anzahl d. Freiheitsgrade σ = Signifikanz

A	510:1111			510:1125			510:1787			1111:1125			1111:1787			1125:1787		
	t	f	σ	t	f	σ	t	f	σ	t	f	σ	t	f	σ	t	f	σ
1-10	1,9567	333	(+)	2,975	253	+	1,2054	293	-	1,3053	303	-	0,5621	343	-	1,3077	213	(+)
11-20	4,0337	333	+	2,0503	253	+	2,3713	293	+	1,3113	303	-	1,5129	343	-	0	213	-
21-30	3,6237	333	+	1,4065	253	-	5,4560	293	+	1,7533	303	-	1,2330	343	-	4,2615	213	+
31-40	6,4675	338	+	4,1711	253	+	3,0017	293	+	1,1738	303	-	2,3351	343	+	3,4310	213	+
41-50	3,0151	388	+	3,5777	253	+	13,4110	293	+	0,4119	303	-	7,4107	343	+	10,4045	213	+
51-60	0,0201	388	-	5,4336	253	+	0,7903	293	+	5,0495	303	+	0,5936	343	-	7,2373	213	+
61-70	4,7252	343	+	6,5335	253	+	6,1057	293	+	2,0943	303	+	0,3631	343	-	1,0441	213	(+)
71-80	4,1410	388	+	0,4405	253	-	0,4331	293	-	3,4341	303	+	3,4634	343	+	0,1105	213	-

A = 51 - 60 (= 62,5-75 %) eine positive Signifikanz.
Nr. 510 ist auch gegen Nr. 1125, mit Ausnahme der Bereiche 21 - 30 (= 25-37,5%) sowie 71 - 80 (= 87,5-100 %) signifikant abgesetzt. Die Abgrenzung 510 : 1787 ist mit Ausnahme der Bereiche 1 - 10 (= 0-12,5 %) und 71 - 80 (= 87,5 - 100%) ebenfalls statistisch gesichert.

Nr. 1111 ist gegenüber Nr. 1125 nur in dem Bereich 51 - 80 (= 62,5-100 %) mit einer positiven Signifikanz abgesetzt, in dem Bereich 1 - 50 (= 0 - 62,5%) ist die Abgrenzung nicht signifikant.

Eine positive Signifikanz zwischen 1111 und 1787 herrscht nur in den Bereichen 31 - 50 sowie 71 - 80.

Die Abgrenzung von 1125 ist gegenüber 1787 in allen Bereichen mit Ausnahme zwischen 11 - 20 (= 12,5-25 %) und zwischen 71 - 80 (87,5 - 100%) statistisch gesichert.

(2.3) Spektrale Absorptionsverteilungskurven

Sowohl für die normalen Lymphozyten als auch für die vier Leukosefälle weisen die Spektralverteilungskurven identischen Charakter auf (Abb. 17).

Das Maximum liegt stets bei 570 - 575 nm. Der Maximalwert streut ohne Fallspezifität zwischen 56 und 60 Absorptionsprozenten. Bei der Abb. 17 sind auf der Ordinate die Transmissionswerte aufgetragen.

Prototyp einer spektralen Absorptionsverteilungskurve
(Fall Nr. 1111)

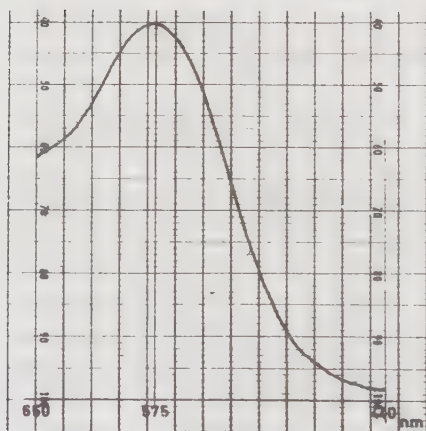


Abb. 17

E D I S K U S S I O N d e r E R G E B N I S S E

Es wurden vergleichende mikrospektrophotometrische Untersuchungen an Lymphknoten gesunder sowie an tumoröser lymphatischer Leukose erkrankten Schafe durchgeführt. Zwei der Tumorformen (Fall Nr. 1111 und Fall Nr. 1787) konnten histologisch als vorwiegend reifzellige lymphatische Leukose, die anderen beiden (Fall Nr. 510 und Fall Nr. 1125) als vorwiegend unreifzellige lymphatische Leukose angesprochen werden.

Von ca. 100 Zellen/Fall wurde mit dem Schnellmeßverfahren der Gesamt-DNS-Gehalt bestimmt, bei weiteren ca. 25 Kernen im Einzelpunktmeßverfahren das DNS-Verteilungsmuster ermittelt. Davon entfielen bei den Normaltieren zwei Drittel, bei den Tumorzellen etwa die Hälfte bis drei Viertel der Zellen auf die G_1 -Phase.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann für jeden Fall eine Stammlinie bestimmt werden. Bei der Erstellung der DNS-Verteilungsmuster sind sowohl zwischen den normalen Lymphozyten und den Tumorzellen als auch zwischen den letzteren untereinander deutliche Unterschiede zu erkennen.

Der G_1 -Wert der Normallymphozytenpopulation (diploider DNS-Gehalt) beträgt 48,3 Arbeitseinheiten, der Mittelwert der Gesamtpopulation $49,24 \pm 3,4$ AE. Zwei Leukosefälle (Nr. 510 und Nr. 1111) besitzen eine nahezu identische Stammlinie im hyperdiploiden Bereich (ca. 21% über G_1 der normalen Lymphozyten). Bei einem weiteren Leukosefall (Nr. 1125) ist die Hyperdiploidie noch deutlicher ausgeprägt (ca. 27% über NZ), während der vierte Fall eine um 15,8% gegenüber den normalen Lymphozyten niedrigere, hypodiploide Stammlinie besitzt.

Der bei den eigenen Untersuchungen ermittelte diploide DNS-Gehalt liegt um 24% höher als der für Lymphozyten des Menschen von QUEISSER, NOESKE, SANDRITTER und LENNERT (1966) angegebene Wert. Abzesehen von der Möglichkeit gewisser Speziesunterschiede ist zu bedenken, daß bei den eigenen Untersuchungen sämtliche

Zellen der lymphatischen Reihe, die im Abklatschpräparat enthalten sind, zum Gesamt-DNS-Verteilungsmuster beitragen.

QUEISSER, NOESKE, SANDRITTER und LENNERT (1966) hingegen, differenzierten zuerst mit Hilfe einer Pappenheim-Färbung. Jede Zellsorte wurde gesondert gemessen, so daß in das DNS-Verteilungsmuster der Lymphozyten keine Zellen aufgenommen wurden (d.h. vor allem Monozyten, Lymphoblasten, Plasmazellen etc.), welche eine deutliche Verschiebung zu höheren Werten bewirkt hätten.

Auch wegen der folgenden Unterschiede erscheint die Vergleichbarkeit der Untersuchungen fragwürdig: die Wahl des Organmaterials, die Präparation (Fixierung nicht angegeben), die Hydrolyse sowie die vorausgegangene Pappenheim-Färbung. Es ist zu berücksichtigen, daß verschiedene Typen von Mikrospektrophotometern benutzt wurden, " wodurch allein schon die Meßzahlen der erhaltenen relativen Arbeitseinheiten wegen gerätespezifischer Faktoren, selbst bei gleichen Präparaten, differieren " (BOSSE und MEYHÖFER, 1970).

Dieser letztere Umstand ist wahrscheinlich auch mitverantwortlich für die teilweise sehr deutliche Diskrepanz zwischen dem Gesamt-DNS-Gehalt (AE) nach Scanning-Messungen und dem aus den Einzelmessungen der Zellkerne errechneten Wert. Selbst bei Verwendung desselben Präparats lag z.B. bei den normalen Lymphozyten der Gesamt-DNS-Gehalt (AE) nach Einzelmessungen im Mittel um 12,5% unter dem Gesamtwert (AE) der an einem anderen UMSP 1 durchgeführten Messung.

Dabei ist auch zu berücksichtigen, daß der Meßvorgang an beiden Geräten unterschiedlich war. So berichten LEEMANN, RUCH und STRÄULI (1968) ebenfalls von 10-20% Unterschied zwischen Punktmessungen und Scannen an Abklatschpräparaten sowohl von Thymuszellen als auch von Ehrlich-Ascites-Karzinomzellen der Maus. Diese Befunde werden auch von GOLDSTEIN (1970) bei Mikrospektrophotometrie an Erythrozyten und Leukozyten des Frosches bestätigt. LEEMANN, RUCH und STRÄULI (1968) weisen darauf hin, daß bei stark heteropyknotischen Kernen die abweichenden Ergebnisse auf die ausgeprägte Inhomogenität des Chromatins zurückzuführen

ist. Diese Fehlermöglichkeit wird durch das mäanderförmige Messen bedeutend verringert. Die Autoren betonen jedoch andererseits auch, daß der Inhomogenitätsfehler nicht überbewertet werden soll; so seien auch an ziemlich stark heteropyknotischen Leberzellkernen zuverlässige Plugmessungen durchgeführt worden.

Die für die Leukosefälle angegebenen Meßergebnisse können mit Einschränkung des Falles Nr. 510 als zuverlässig gelten, da die Präparate von den Lymphknoten jeweils frisch getöteter Tiere, bzw. von einem frisch exstirpierten Lymphknoten, hergestellt wurden und sofort der weiteren Behandlung zugeleitet wurden.

Das Leukoseschaf Nr. 510 wurde tot aufgefunden, der Tod trat schätzungsweise zwei Stunden vorher ein. Abgesehen von der Unsicherheit dieser Schätzung muß dennoch bei diesem Tier mit einer verhältnismäßig raschen Autolyse gerechnet werden, da einerseits die Jahreszeit (Oktober), andererseits das Vlies des Tieres eine selbständige Abkühlung der Leiche nahezu völlig verhinderte. Somit ist es denkbar, daß die Gesamt-DNS-Werte des hier aufgestellten Histogramms in Wirklichkeit höher anzusetzen sind. So berichten ADLER und BECKHOVE (1971) von einem raschen postmortalen DNS-Abbau.

Im DNS-Verteilungsmuster liegen bei den normalen Lymphozyten die Meßwerte zweier Zellen deutlich von der G_1 -Population getrennt. Es ist anzunehmen, daß sich diese Zellen in der S-Phase befinden. G_2 -Werte fehlen. Damit zeigt also das normale Lymphknotengewebe eine sehr geringe Tendenz zur DNS-Synthese (2%). Hingegen liegen bei Fall Nr. 510 4% der Meßwerte zwischen G_1 - und G_2 -Wert und stammen somit wahrscheinlich von Zellen der S-Phase. Der Bereich um G_2 wird insgesamt durch 8% der Meßwerte repräsentiert. Im Vergleich zu den normalen Lymphozyten ist also bei Fall Nr. 510 eine deutliche Vermehrungstendenz feststellbar.

Bei Fall Nr. 1111 stammen 2% der Meßwerte von Zellen der S-Phase, nur 1 Meßwert unter 100 entspricht G_2 -Phasekernen. Die Synthesetendenz ist also bei diesem Fall sehr schwach ausgeprägt.

Fall Nr. 1125 zeigt wieder eine sehr deutliche Vermehrungstendenz: 6% der ausgemessenen Zellkerne befinden sich in der S-Phase.

se, 3% in der G_2 -Phase.

Auch Fall Nr. 1787 zeigt eine deutliche Streuung der Werte: 7% der gemessenen Zellkerne fallen dem Gesamt-DNS-Gehalt nach in die S-Phase, 8% der Zellkerne in die G_2 -Phase.

Die DNS-Verteilungsdiagramme erlauben also einen allgemeinen Überblick, auch wenn die statistische Signifikanz dieser Angaben nicht überprüft wurde.

Eine weitere Gesamtbeurteilung jeder G_1 -Zellpopulation erfolgte mit Hilfe des Absorptionshäufigkeitsdiagramms, mit der absoluten sowie mit der normierten Absorptionsniveaueurve. Da diese letztlich nur drei verschiedene Darstellungsformen ein- und desselben Ergebnisses sind, soll hier nur die normierte Absorptionsniveaueurve wegen der besseren Vergleichbarkeit diskutiert werden.

Mit ihrer Hilfe kann ein Befund objektiviert werden, der bereits aus dem Absorptionshäufigkeitsbild zu vermuten ist. Es handelt sich dabei um die relative Zunahme der höchsten Absorptionswerte (speziell der über dem Wert von 50) bei Tumorzellen. Dabei entfallen 46,5 - 53,7% des mittleren Gesamt-DNS-Gehaltes dreier Leukosefälle (Nr. 1111, Nr. 1125, Nr. 1787) auf den Absorptionsbereich zwischen 50 und 80, gegenüber weniger als 30% bei den normalen Lymphozyten. Bei Leukosefall Nr. 510 ist dieser Bereich zwar auch nur zu 30% am Gesamt-DNS-Gehalt beteiligt, die Werte verteilen sich jedoch nicht gleichmäßig wie bei normalen Lymphozyten, sondern unter starker Betonung des Absorptionsbereiches zwischen 50 und 60. Diese Befunde können im Sinne der von HARBERS und SANDRITTER (1968 b) sowie von HARBERS, LEDERER, SANDRITTER und SPAAR (1968 a) beschriebenen, vermehrten Heterochromasie bei Tumorzellen gedeutet werden. Demnach zeichnen sich die normalen Lymphozyten durch das überwiegende Vorkommen relativ gleich dichter Partikel aus, nur ein geringer Prozentsatz zeigt dichtere oder lockere Beschaffenheit, was auch in der stärkeren oder schwächeren Anfärbbarkeit zum Ausdruck kommt. Wie bei den von SANDRITTER, KIEFER G., SCHLÜTER und MOORE (1967) untersuchten Ascitestumoren kann auch bei unseren Leukosefällen eine deutliche Erhöhung der Anzahl der

dichten Zellkernpartikel beobachtet werden.

Es erscheint bemerkenswert, daß trotz der deutlichen Unterschiede in der Absorptionswertverteilung histologisch keine entsprechenden Unterschiede zwischen den Zellen der einzelnen Leukosefälle zu finden sind. Somit wäre eine Klassifikation mit Hilfe der hier beschriebenen Methode möglich.

In Anbetracht der dadurch aufgezeigten Möglichkeit der objektiven Charakterisierung kann der Begriff der Hyperchromasie von Tumorzellen klar belegt und dadurch auch vergleichbar gemacht werden. Somit werden Spekulationen über Ploidiestufe und DNS-Gehalt, die sich nur auf den subjektiven Eindruck der Anfärbbarkeit von Tumorzellkernen stützen, übereinstimmend mit HÄMMERLI (1970) und ATKIN (1970), ad absurdum geführt.

Um individuelle Charakteristiken eines bestimmten Zelltyps erkennen zu können, wurde eine Niveauabgrenzung der über einen Zellkern gewonnenen Absorptionsdaten vorgenommen. Dabei wurden die zur S-Phase gehörenden Zellen von der Auswertung ausgeschlossen, um eine gewisse Einheitlichkeit der Population zu gewährleisten. Trotz der Annahme einer unveränderten Kondensation der heteropyknotischen Chromosomen-Abschnitte während der Replikation (CITOLER und GROPP, 1969) kann nämlich eine Inkonzanz nicht ausgeschlossen werden. So liegen zumindest für das Sexchromatin Befunde von SCHNEDL (1969 b) vor, nach denen die Häufigkeit dieses Chromozentrums im Zellzyklus - auch während der G_1 -Phase - zunimmt. Somit ist durch die getroffene Auswahl die Fehlermöglichkeit nicht gänzlich eliminiert, da alle untersuchten Tiere weiblichen Geschlechts waren.

Weitere Beweggründe zur Ausscheidung der S-Phasezellen waren die mögliche Kumulierung replizierender Abschnitte (COMINGS 1970 b) sowie Befunde von BENES und ROTREKLOVA (1966), nach denen bei der Feulgen-Hydrolyse von Tumorzellen der S-Phase bis zu 50-74 % mehr DNS herausgelöst werden kann als bei den Zellen der G_1 -Phase.

Außerdem war noch zu berücksichtigen, daß bei der Auswertung nicht nur besonders prominierende, stark absorbierende Zentren

erfaßt werden sollen, sondern ebenso andere, "negative" Kernstrukturen, wie z.B. der Nukleolus oder zumindest nukleolus-ähnliche Formationen. Auch für diese Strukturen wurde von GONZALEZ und NARDONE (1968) eine zyklische Veränderung während der Interphase beschrieben. Diese Tatsache erlangt auch hinsichtlich der manchmal ungewissen Differenzierung zwischen Chromozentren und Nukleolen (CITOLER und GROFF, 1969) eine zusätzliche Bedeutung.

Somit steht man vor der Entscheidung, entweder für den Gesamteindruck und auch für die Orientierung wichtige Strukturen unberücksichtigt zu lassen oder deren inkonstantes Auftreten in Kauf zu nehmen.

Wie es sich nun zeigte, war es gerade für die Unterscheidung zwischen den Kernen von Fall Nr. 1111 und Fall Nr. 510 oder auch zwischen Nr. 1111 und Nr. 1125 wertvoll, die Position sehr niedrig absorbierender Kernstrukturen mit in die Betrachtung einzubeziehen. Es ist denkbar, daß mit den sog. "leeren Regionen" die Position der Nukleolen umrissen wurde, die wahrscheinlich im lichtoptischen Bild durch lockeres Chromatin verschleiert vorliegen. Zumindest die enge Lagebeziehung zu den dichten Chromozentren ("nucleolus associated heterochromatin" - LIMA DE FARIA, REITALU, O'SULLIVAN, 1965) erlaubt eine solche Spekulation.

Die sich daraus ableitende Schlußfolgerung wäre, daß man den Kernen der Fälle 510 und 1125 eine größere metabolische Aktivität zusprechen müßte als den Zellkernen der anderen Leukosefälle oder der normalen Lymphozyten. Dadurch stellt sich konsequenterweise die Frage nach der Zuverlässigkeit des Gesamt-DNS-Verteilungsdiagramms. Ist es möglich, daß am hyperdiploiden Gesamt-DNS-Gehalt eine "metabolische DNS" beteiligt ist? Eine Klärung dieses Problems dürfte mit den heute anwendbaren Mitteln nur schwer möglich sein.

Es soll nun nicht der Eindruck erweckt werden, als wäre mit der Wahl mehrerer Kriterien für die Auswertung der Niveauabgrenzungsbilder ein absoluter Vorteil gewonnen. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß sich gerade bei mehreren

"Nukleolen" und dementsprechend vielen Chromozentren die Unterschiede zwischen zwei Zelltypen (z.B. Nr. 510 und Nr. 1125) verwischen können. Gerade in solchen Fällen gelangt man wahrscheinlich mit einem Verfahren, das von WIED, BARTELS, BAHR und OLDFIELD (1968) bzw. von BARTELS, WIED und BAHR (1968) angewendet wird, zu einer übersichtlicheren Niveauabgrenzung und somit vielleicht auch zu einer klareren Abtrennung.

Die genannten Autoren verwenden bei derselben wenn auch computergesteuerten Methode nur die zwei untersten und die zwei höchsten Niveaubereiche, um das am UMSP gewonnene Zahlenraster zu kennzeichnen. Die Auswahl der Niveaugrenzen erfolgte bei dieser Anwendung nur unter dem Aspekt, die Extinktionshäufigkeitsverteilung in möglichst gleiche Abschnitte einzuteilen. Als Ergebnis berichten BARTELS, WIED und BAHR (1968) von zwei verschiedenen Zeichenmustern bei lichtoptisch nicht unterscheidbaren Zellen (Kulturen von embryonalem Lungengewebe und von Plattenepithelkarzinom): der eine Zelltyp ist durch ein ringförmiges Muster gekennzeichnet, der andere durch eine zusätzliche, konzentrische Innenstruktur.

Alle sonstigen Kernstrukturen, einschließlich der Kernbegrenzung, wurden bei dieser Darstellungsform nicht berücksichtigt. Es ist jedoch bei unseren Fällen nicht möglich, eine auch nur annähernde Lagekonstanz bestimmter heterochromatischer Abschnitte in Beziehung zur Kernmembran zu erkennen. Insbesondere die extrem randständigen Chromozentren, die nach der Modellvorstellung von COMINGS (1968) nur relativ wenig Bewegungsfreiheit besitzen, wären zur Untersuchung dieser Problematik geeignet. Eine diesbezüglich mangelnde Aussagekraft der hier vorgelegten Untersuchungen beruht zu einem großen Teil sicher auf der verhältnismäßig groben Meßpunktauflösung von 0,5 μ . Nur bei den Zellkernen des Falles Nr. 1125 ist ein deutlich heterochromatischer Block, klar vom übrigen Niveauabgrenzungsbild abgesetzt, in Nähe der Kernmembran zu erkennen. Es ist möglich, daß es sich dabei um das heteropyknotische (inaktivierte) X-Chromosom handelt, trotzdem im mikroskopischen Bild derselben Zellen dieser Bereich nicht eindeutig als Sexchromatin ansprechbar ist.

Ogleich die absoluten Positionen der Chromozentren keine Gesetzmäßigkeit erkennen lassen, erweist es sich doch als ziemlich wertvoll, eine vergleichende Beurteilung der dichten Regionen zu ihrer Umgebung durchzuführen. Dadurch wird auch der Begriff des Chromozentrums nicht auf einen bestimmten Absorptionswert festgelegt. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn Zellkerne unterschiedlicher Größe - aber mit gleichem DNS-Gehalt - verglichen werden sollen, bei denen auf Grund des unterschiedlichen Kernvolumens die absoluten Absorptionswerte stark differieren müssen.

Diesen Vergleich des Grades der Abgrenzung dichter Gebiete gegenüber ihrer unmittelbaren Umgebung spielt bei der Charakterisierung der Zellkerne von Fall Nr. 1111, insbesondere gegenüber den normalen Lymphozyten, eine bedeutende Rolle. Bei jenen besteht eine besonders gute Abgrenzbarkeit der vorkommenden Chromozentren, während bei den normalen Lymphozyten in der Regel die Niveaugrenzen verwischt sind.

So sind weiterhin die Zellen des Leukosefalles Nr. 1787 in ihrem Strukturbild nur auf Grund dieses Kriteriums von den Normalzellen zu unterscheiden. Daneben spielt die absolute Anzahl der Chromozentren für die Unterscheidung nur eine untergeordnete Bedeutung. Häufig ist nämlich bei Nr. 1787 eine Tendenz zur Konfluation der Chromozentren zu verzeichnen.

Unter diesem Aspekt ist gerade bei letztgenanntem Leukosefall die Frage berechtigt, inwieweit tatsächlich Tumorzellen zur Auswertung gelangten und nicht normale Lymphozyten. Bei der Differenzierung des Zellbildes im Abklatschpräparat wurden 93% scheinbar normale Lymphozyten festgestellt, welche sich allenfalls im Beginn einer Tumortransformation befinden könnten.

Ein weiteres Kriterium ist die Beurteilung der äußeren Kontur des Niveauabgrenzungsbildes. Danach stehen sich zwei deutlich abgrenzbare Zelltypen gegenüber: normale Lymphozyten, Leukosefall Nr. 1787 und Nr. 1111 einerseits, welche einen ziemlich geschlossenen Eindruck erwecken, sowie andererseits die Zellen der Leukosefälle Nr. 510 und Nr. 1125, deren Kontur des Niveau-

abgrenzungsgebietes einen aufgelockerten "ausgefranst" Eindruck macht. Es wurde bereits an früherer Stelle erwähnt, daß dies sicher zum Teil auf randständige Lagen der "leeren Gebiete" zurückzuführen ist.

Die deutliche Abgrenzbarkeit der genannten Zelltypen bestand bei allen untersuchten Zellkernen, bis auf ein Exemplar der Nr. 1111, welches große Ähnlichkeit mit den typischen Zellkernen der Nr. 510 aufwies.

Zusammenfassend ist also zu bemerken, daß ein bestimmter Zelltyp mit Hilfe des Niveauabgrenzungsbildes charakterisiert werden kann, ohne eine Aussage über Funktionen oder potentielle Fähigkeiten - z.B. die Dignität einer Tumorzelle - zu erlauben, sofern überhaupt, mit der Beurteilung der individuellen Zelle allein, solche Charakteristika umrissen werden können.

Bei der Typisierung der Kernstruktur ist es nicht möglich, praesumtiv ein bestimmtes Kriterium anzuführen, das, bei den vielen Variationsmöglichkeiten der Zellkernstruktur, stets zu einer klaren Entscheidung führt. Es ist vielmehr notwendig, mehrere Kriterien von Fall zu Fall neu zu erwählen, die sich in ihrer Aussagekraft gegenseitig unterstützen. So kann auch auf Grund der vorliegenden Untersuchung keine Voraussage darüber gemacht werden, inwieweit sich die hier aufgestellten Unterscheidungskriterien auch nützlich zur Charakterisierung von Tumorzellen weiterer Leukoseschafe erweisen werden. Diese Einschränkung erfolgt vor allem in Hinblick auf die begrenzte Anzahl der untersuchten Zellkerne, was in erster Linie auf die Schwierigkeiten bei der rein manuellen Auswertung der Ergebnisse zurückzuführen ist.

Jede entsprechende Untersuchung, die in etwas größerem Umfang durchgeführt werden soll, führt zu einer Flut notwendiger Meßdaten, die nur noch auf elektronischem Wege zu bewältigen ist, sofern die Untersuchungen noch ein bestimmtes Maß an Rationalität beinhalten sollen. Der dadurch notwendig werdende apparative Aufwand beschränkt die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode zumindest in dem Maße, als sie noch eine praktische Bedeutung - wenn auch keine diagnostische Aussagekraft - für die Tumorcharakterisierung besitzt.

F Z U S A M M E N F A S S U N G

Im Literaturteil wird eine Übersicht über die Bausteine des Zellkernes, sowie über die Grundlagen der Mikrospektrophotometrie gegeben.

Es werden feulgengefärbte Abklatschpräparate von Lymphknoten normaler Schafe, sowie von vier Schafen, welche an der tumorösen Form einer enzootisch auftretenden lymphatischen Leukose erkrankt sind, mit Hilfe der Mikrospektrophotometrie (UMSP 1) untersucht.

Von jedem Fall werden 100 Zellen im Schnellmeßverfahren zur Erstellung eines Gesamt-DNS-Verteilungsmusters ausgemessen. Der G_1 -Wert der normalen Lymphozyten stellt den diploiden DNS-Gehalt dar. Drei Leukosefälle zeigen demnach Stammlinien im hyperdiploiden Bereich, ein weiterer Leukosefall besitzt eine hypodiploide Stammlinie.

Durchschnittlich 25 Zellkerne pro Fall werden punktweise (Meßpunktabstand 0,5 μ) ausgemessen. Aus den Einzelwerten des so gewonnenen Zahlenrasters wird der Gesamt-DNS-Gehalt (in Arbeitseinheiten) der betreffenden Zellkerne errechnet. Diese Werte zeigen im Mittel deutliche Unterschiede zu den im Schnellmeßverfahren gewonnenen Ergebnissen. Die Ursache dieser Diskrepanz wird diskutiert.

Mit Hilfe der Einzelwerte werden weiterhin Absorptionshäufigkeitsverteilungskurven, absolute, sowie normierte Absorptionsniveaueurven erstellt. Mit der letzteren Darstellungsform kann gezeigt werden, daß bei den Leukosefällen der Absorptionsbereich zwischen 50 und 80 mit 46 bis 53%, gegenüber ca. 30% bei den normalen Lymphozyten, bedeutend stärker an der Bildung des Gesamt-DNS-Wertes beteiligt ist.

An Hand der Zahlenraster werden Niveauabgrenzungsbilder für die Zellkerne der G_1 -Phase erstellt. Dabei werden benachbarte

Absorptionswerte, die um weniger als 3-4 Absorptionseinheiten differieren, durch eine gemeinsame Umgrenzung zu einem Feld zusammengefaßt. Diese Gebiete werden je nach Größe der Absorptionswerte mehr oder weniger dicht schraffiert. Beim Vergleich dieser Schraffiermuster zeigt sich, daß unter Verwendung mehrerer Kriterien (Anordnung und Anzahl der "dichten", sowie der "hellen" Gebiete, Kontur des Niveauabgrenzungsgebietes) eine typische Struktur für die Zellkerne der leukotisch veränderten Lymphknoten beschrieben werden kann, die im Regelfall zur Abgrenzung gegenüber den normalen Lymphozyten zu gebrauchen ist. Auch bietet die Struktur des Niveauabgrenzungsbildes eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den Tumorzellen untereinander, was mit Hilfe des lichtmikroskopischen Bildes nicht möglich ist.

Es wird die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode einschließlich ihrer Grenzen, insbesondere mit Hinsicht auf die praktische Tumordiagnostik, diskutiert.

S U M M A R Y

The review of the literature casts a general look on the structure of the cell-nucleus and the fundamentals of microspectrophotometry.

The thesis itself attempts an analysis of feulgen-stained smear-preparations of lymphnodes of a healthy sheep and four sheep with tumorous enzootic lymphatic leucosis (lymphosarcoma).

From each sheep 100 cells are measured by means of the scanning microspectrophotometry (UMSP 1) in order to establish a pattern of the total-DNA-distribution. According to this pattern three cases of leucosis show stem-lines in the hyperdiploid range which is related to the G_1 -value of normal lymphocytes. Another case shows a hypodiploid stem-line.

An average of 25 nuclei per case are measured point for point (distance between points : 0,5 μ).

From the single values of these number screens there is computed the total-DNA-content (by arbitrary units) of the counted nuclei. These values show significant differences compared with those results obtained by the scanning method. The cause of this discrepancy is discussed.

By means of the single values diagrams of the frequency distribution of the absorptions and absolute as well as standardized diagrams of the absorption levels are established. The latter diagram shows that in the absorption range between 50 and 80 the cases of leucemia are more heavily involved in the total-DNA-value than the normal lymphocytes and that by a difference of 46-53% as opposed to about 30%.

In the number screens there are drawn niveau range contours of the nuclei of the G_1 -phase. Thereby, neighbouring absorption values which differ by less than 3-4 absorption units are collected by a common border. These range contours are

hatched according to the volume of the absorption values. Comparing these hatch patterns it can be shown that by use of several criteria (such as the distribution and number of the " dark " and " light " ranges; the shape of the range contours) a typical structure of the nuclei emerges. This structure may generally be used in order to distinguish the normal from the altered lymphocytes as well as to distinguish the tumour cells of the different cases. This could not be done as easily by lightmicroscopy.

The practical use and the limits of this method, especially with respect to the tumor diagnosis are discussed.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADLER C.P., BECKHOVE Ph., 1971
Postmortale DNS-Veränderungen im Herzmuskel.
Beitr.Path. 142, S. 306-320
- ALFERT M., 1950
A cytochemical study of oogenesis and cleavage
in the mouse.
J.Cell.Comp.Physiol. 36, S. 381-409
- ALFERT M., SWIFT H., 1953
Nuclear DNA constancy: a critical evaluation of
some exceptions reported by Lison and Pasteels.
Exp.Cell Res. 5, S. 455-460
- ALLFREY V.G., LITTAU V.C., MIRSKY A.E., 1963
On the role of histones in regulating RNA syn-
thesis in the cell nucleus.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 49, S. 414-418
- APPLETON T.C., PELC S.R., TARBIT M.H., 1969
Formation and loss of DNA in intestinal epithelium.
J.Cell Sci. 5, S. 45-55
- ARNOLD M., 1968
Histochemie. Einführung in Grundlagen und Prinzi-
pien der Methoden.
Springer-Verlag, Berlin
- ATKIN N.B., 1962
The relationship between the DNA content and the
ploidy of human tumours.
Cytogenetics 1, S. 113-122
- ATKIN N.B., 1970
The chromosome number of "hypochromic" cancer cells.
Acta Cytologica 14, S. 463
- ATKIN N.B., BECAK W., OHNO S., 1965
The comparative DNA-content of 19 species of pla-
cental mammals, reptiles and birds.
Chromosoma 17, S. 1-10

- ATKIN N.B., MATTINSON G., BAKER M.C., 1966
A comparison of the DNA content and chromosome number of a fifty human tumours.
Brit.J.Cancer 20, S. 87-101
Berichte Path. 74, S.27, 1967/68
- ATKIN N.B., RICHARDS B.M., 1956
DNA in human tumours as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: a comparison of tumours arising at different sites.
Brit.J.Cancer 10, S. 769-786
- BARR M.L., 1966
The significance of the sex chromatin.
Int.Rev.Cytol. 19, S. 35-95
- BARR M.L., BERTRAM E.G., 1949
A morphological distinction between neurones of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis.
Nature 163, S. 676-677
- BARTELS P.H., WIED G.L., BAHR G.F., 1968
Cell recognition from equiprobable extinction range contours.
Acta Cytologica 12, S. 205-217
- BASERGA R., 1968
Biochemistry of the cell cycle: a review.
Cell and Tissue Kinetics 1, S. 167-191
- BASRUR P.K., GILMAN J.P.W., McSHERRY B.J., 1964
Cytological observations on a bovine lymphosarcoma.
Nature 201, S. 368-371
- BAUER H., 1932
Die Feulgen'sche Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen.
Z.Zellforsch. 15, S. 225-247
- BAYREUTHER K., 1960
Chromosomes in primary neoplastic growth.
Nature 186, S. 6-9

- BENASSI E., PICOTTI F., 1970
Analysis of normal and irradiated human leucocyte
proliferative kinetics by means of the UMSP-deter-
mination of DNA.
Strahlentherapie 139, S. 40-42
- BENES L., ROTREKLOVA E., 1966
Loss of tritium activity from ^3H -Thymidine labe-
led cells.
Exp. Cell Res. 43, S. 657-700
- BENWITZ G., 1965
Nähere Untersuchungen zur Lichtbleichung feulgen-
gefärbter Kerne, Mikrospektrophotometrie.
Acta histochem. 21, S. 238-260
Berichte Path. 72, S. 490, 1967
- BERLOWITZ L., PALLIOTTA D., SIBLEY C.H., 1969
Chromatin and histones: binding of tritiated Actino-
mycin D to heterochromatin in mealy bugs.
Science 164, S. 157-158
- BLACK M.M., ANSLEY H.R., MANDL R., 1964
On cell specificity of histones.
Arch.Path. 78, S. 350-368
- BLOCH D.P., HEW H.Y.C., 1960
J.biophys.biochem.Cytol. 7, S. 515-532
Hinweis bei Kiefer G., Kiefer R., Sandritter W. 1968
- BÖHM N., 1968 b
Einfluß der Fixierung und der Säurekonzentration
auf die Feulgen-Hydrolyse bei 28°C.
Histochemie 14, S. 201-211
- BÖHM N., SPRENGER E., SCHLÜTER G., SANDRITTER W., 1968 a
Proportionalitätsfehler bei der Feulgen-Hydrolyse.
Histochemie 15, S. 194-203
Berichte Path. 77, S. 560, 1968/69

- BOSSE H.G., MEYHÖFER W., 1970
Zytophotometrische Messungen des Histonprotein-
gehaltes, des DNS-Gehaltes und des Tyrosin/Trypto-
phangehaltes von Spermien.
Andrologie 2, S. 23-39
- BRACHET J., HULIN N., GUERMANT J., 1968
Acid lability of DNA and cell differentiation.
Exp.Cell Res. 51, S. 509-518
- BROWN D.D., 1967
The genes for ribosomal RNA and their transcrip-
tion during amphibian development.
Current Topics in Developmental
Biology 2, S. 47-73
- BROWN S.W., 1966
Heterochromatin.
Science 151, S. 417-425
- BURCK H.C., 1969
Histologische Technik.
Georg Thieme-Taschenbuch, Stuttgart
- CAIRNS J., 1966
J.Mol.Biol. 15, S. 372
Hinweis bei Comings D.E., Kakefuda T.
J.Mol.Biol. 33, S. 225-229, 1968
- CASPERSSON T., 1932
Die quantitative Bestimmung von Thymonuklein-
säure mittels fuchsinschwefliger Säure.
Biochem.Ztschr. 253, S. 97-111
- CHAMBERS R., 1924
in: COWDRY "General Cytology" Chicago, S. 237
Hinweis bei Grundmann E., Stein P.
Beitr.path.Anat. 125, S. 54-76 , 1961
- CITOLER P., GROPP A., 1969
DNS-Replikation von autosomalem Heterochromatin.
Exp.Cell Res. 54, S. 337-346

COMINGS D.E., 1966

Uridine-5-³H-radioautography of the human sex-chromatin body.

J.Cell Biol. 28, S. 437-441

COMINGS D.E., 1967 a

The duration of replication of the inactive X-chromosome in humans based on the persistence of the heterochromatic sex chromatin body during DNA-synthesis.

Cytogenetics 6, S. 20-37

COMINGS D.E., 1968

The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus.

Amer.J.hum.Genet. 20, S. 440-460

COMINGS D.E., 1970 a

The distribution of sister chromatids at mitosis in Chinese Hamster cells.

Chromosoma 29, S. 428-433

COMINGS D.E., 1970 b

Quantitative autoradiography of heterochromatin replication in *Microtus agrestis*.

Chromosoma 29, S. 434-445

COMINGS D.E., KAKEFUDA T., 1968

Initiation of DNA replication at the nuclear membrane in human cells.

J.Mol.Biol. 33, S. 225-229

COMINGS D.E., OKADA T.A., 1970 a

Association of nuclear membrane fragments with metaphase and anaphase chromosomes as observed by whole mount electron microscopy.

Exp.Cell Res. 63, S. 62-69

COMINGS D.E., OKADA T.A., 1970 b

Condensation of chromosomes onto the nuclear membrane during prophase.

Exp.Cell Res. 63, S. 471-473

- COMINGS D.E., OKADA T.A., 1970 c
Mechanism of chromosome pairing during meiosis.
Nature 227, S. 451-456
- DARLINGTON C.D., 1937
"Recent Advances in Cytology" 2 nd Edition.
Blakiston, Philadelphia
- DAVIES H.G., 1968
Electron microscope observations on the hetero-
chromatin in certain cells.
J.Cell Sci. 3, S. 129-149
- DE COSSE J., AIELLO N., 1966
Feulgen hydrolysis, effect of acid and temperature.
J.Histochem.Cytochem. 14, S. 601-604
- DEITCH A.D., WAGNER D., RICHART R.M., 1968
Conditions influencing the intensity of the Feulgen
reaction.
J.Histochem.Cytochem. 16, S. 371-379
- DE LANGE R.J., SMITH E.L., 1968
Amino acid sequence of histone: presence of
-N-Acetyllysine.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 61, S. 1145-1146
- DI STEFANO H.S., 1948
A cytochemical study of the Feulgen nucleal reaction.
Chromosoma 3, S. 282-301
- DÖRMER P., SCHMOLKE W., MUSCHALIK P., BRINKMANN W., 1970
Die DNS-Synthesegeschwindigkeit im Verlaufe der
DNS-Synthesephase von Erythroblasten der Maus in
vivo.
Beitr.Path.141, S. 174-186
- DU PRAW E.J., BAHR G.F., 1969
The arrangement of DNA in human chromosomes.
Acta Cytologica 13, S. 188-205
- DUTT M.K., 1969
In situ Feulgen reaction with Schiff reagent at
different temperatures.
Experientia 25, S. 783-784

- EDER M., 1966
Zellerneuerung im Magen-Darm-Trakt.
Verh.dtsch.Ges.Path.50, S. 75-90
- EHLERS G., 1966
Cytophotometrische Untersuchungen an Basalzellepi-
theliomen im ultravioletten und sichtbaren Licht.
Arch.klin.exp.Dermatol.224, S. 329-354
- ELCKE J., EMMINGER A., STRAUSS Ch., MOHR U., WRBA H., 1965
Cytogenetisch-karyologische Studien an klinisch
behandelten gynäkologischen Tumoren.
Z.Krebsforsch.67, S. 205-212
- EVANS H.J., BIGGER T.R.L., 1961
Chromatid aberrations induced by gamma irradiation.II.
Genetics 46, S. 277-289
- FEULGEN R., ROSSENBECK H., 1924
Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure
vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf be-
ruhende elektive Färbung von Zellkernen.
Z.physiol.Chemie 135, S. 203-248
- FILKUKA J., ADAMEK R., LEDERER B., 1968
Chromosomenzahl und DNS-Gehalt eines Übertragbaren
rundzelligen Mäusecarcinoms (BO-Tumor).
Z.Krebsforsch.70, S. 236-241
- FILKUKA J., SCHLÜTER G., 1966
Chromosomenzahl und DNS-Gehalt eines pseudodiploi-
den Ehrlich-Ascites-Tumors.
Verh.dtsch.Ges.Path.50, S. 312-316
- FORD C.E., JACOBS P.A., LAJTHA L.G., 1958
Human somatic chromosomes.
Nature 181, S. 1565-1568
- FREED J.J., ENGLE J.L., 1962
Development of the vibrating mirror flying spot
microscope for ultraviolet spectrophotometry.
Ann.N.Y.Acad.Sci.97, S. 412-423

FRIEDMAN D.L., MUELLER G.C., 1969

Studies on the nature of replicating DNA of HeLa cells.

Biochim.Biophys.Acta 174, S. 253-263

GARCIA A.M., 1962

Studies on DNA in leucocytes and related cells.

I. Microspectrophotometric errors and statistical models

II. On Feulgen reaction.

Histochemie 3, S. 170-194

GARCIA M.A., 1967

On Feulgen haploid and diploid values.

J.Histochem.Cytochem.15, S. 778

GHOSH S., GHOSH I., 1970

Karyological studies on two HeLa lines.

Z.Krebsforsch.74, S. 103-110

GHOSH S., LETTRE R., 1970

DNA synthetic pattern in the nucleolus

I. Chicken fibroblasts

II. Chinese Hamster cells.

J.Cell Biol. 45, S. 177-182

GOLDSTEIN D.J., 1970

Aspects of scanning microdensitometry.

I. Stray light (glare).

J.Microscopy 92, S. 1-16

GONZALEZ S.P., NARDONE R.M., 1968

Cyclic nucleolar changes during the cell cycle.

I. Variations in number, size, morphology and position.

Exp.Cell Res. 50, S. 599-615

GRAUMANN W., 1953

Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagenzes.

Z.wissensch.Mikroskopie 61, S. 225-226

- GROPP A., CITOLER P., 1969
"Patterns of autosomal heterochromatin" in
K.Benirschke
"Comparative Mammalian Cytogenetics".
Springer-Verlag, Berlin, S. 267-276
- GROPP A., CITOLER P., GEISLER M., 1969
Karyotypvariation und Heterochromatinmuster bei
Igel.
Chromosoma 27, S. 288-307
- GROPP A., KLEE F., 1969
Ergebnisse der Lymphozytenkultur in vitro bei
Lymphadenosen.
Verh.dtsch.Ges.Path. 53, S. 503-508
- GROPP A., ODUNJO F., 1963
Beobachtungen zur morphologischen Konkordanz homo-
loger Chromosomen somatischer Zellen.
Exp.Cell Res. 30, S. 577-582
- GRUMBACH M.M., MORISHIMA A., 1962
Acta Cytologica 6, S. 46, Hinweis bei Barr 1966
- GRUMBACH M.M., MORISHIMA A., TAYLOR J.H., 1963
Human sex chromosome abnormalities in relation to
DNA replication and heterochromatinization.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 49, S. 581-589
- GRUNDMANN E., 1964
Allgemeine Cytologie.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart
- GRUNDMANN E., STEIN P., 1961
Über das organspezifische Chromatin im normalen
und im carcinomatösen Parenchymzellkern.
Verh.dtsch.Ges.Path. 45, S. 93-97
- HAEMMERLI G., 1970
The chromosome number of "hypochromic" cancer cells.
Acta Cytologica 14, S. 463

- HAEMMERLI G., FJELDE A., ZWEIDLER A., STRÄULI P., 1966
Heterologous transplantation, chromosome analyses,
and DNA measurements of the human carcinoma tissue
culture line H.Ep.2.
J.Nat.Cancer Inst. 36, S. 673-683
- HARBERS E., 1969
Nucleinsäuren. Biochemie und Funktionen.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart
- HARBERS E., LEDERER B., SANDRITTER W., SPAAR U., 1968 a
Untersuchungen an Nucleohistonen
IV. Heterochromatisierung in der Rattenleber wäh-
rend der Carcinogenese.
Virchows Archiv B 1, S. 98-106
- HARBERS E., SANDRITTER W., 1968 b
Gesteigerte Heterochromatisierung als pathogeneti-
sches Prinzip.
Dtsch.med.Wschr. 93, S. 269-271
- HARE W.C.D., McFEELY R.A., ABT D.A., FEIERMAN J.R., 1964
Chromosomal studies in bovine lymphosarcoma.
J.Nat.Cancer Inst. 33, S. 105-118
- HARE W.C.D., YANG T.J., McFEELY R.A., 1967
A survey of chromosome findings in 47 cases of
bovine lymphosarcoma (leukemia).
J.Nat.Cancer Inst. 38, S. 383-392
- HAUSCHKA T.S., 1963
Chromosome patterns in primary neoplasia.
Exp.Cell Res.Suppl. 9, S. 86-98
- HEIL B., 1970
Spätreplicierendes X-Chromosom und Sexchromatinhäu-
figkeit beim Menschen.
Humangenetik 9, S. 64-74
- HEITZ E., 1928
Das Heterochromatin der Moose.
Jahrbuch der wissensch.Botanik 69, S. 762-818

- HEITZ E., 1933
Die Herkunft der Chromozentren.
Planta 18, S. 571-636
- HEMPEL K., 1968
Analyse des Zellzyklus der Melanozyten des Harding-Passey-Melanoms der Maus unter besonderer Berücksichtigung der "Growth-Fraction".
Virchows Archiv B 1, S. 15-30
- HERRMANN R., 1967
UV-Mikrospektrophotometrie in Zellen.
Berichte der "Original Hanauer Quarzlampen G.m.b.H.
1, S. 45-54
- HSU T.C., 1962
Differential rate on RNA synthesis between euchromatin and heterochromatin.
Exp.Cell Res. 27, S. 332-334
- HSU T.C., ARRIGHI F.E., 1966
Chromosomal evolution in the genus Peromyscus.
Cytogenetics 5, S. 355-359
- HSU T.C., BRINKLEY N.N., ARRIGHI F.E., 1967
The structure and behavior of the nucleolus organizers in mammalian cells.
Chromosoma 23, S. 137-153
- HUANG R.C.C., BONNER J., 1962
Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 48, S. 1216-1218
- HUANG R.C.C., BONNER J., 1965
Histone-bound RNA, a component of native nucleohistone.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 54, S. 960-967
- HUBERMAN J.A., 1968
Visualization of replicating mammalian and T₄ bacteriophage DNA.
Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol. 33, S. 509-524

- HUBERMAN J.A., RIGGS A.D., 1968
On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes.
J.Mol.Biol. 32, S. 327-334
- ISHIHARA T., KIKUCHI Y., SANDBERG A.A., 1963
Chromosomes of 20 cancer effusions: correlation of karyotypic, clinical and pathologic aspects.
J.Nat.Cancer Inst. 30, S. 1303-1361
- JOBST K., 1962
Versuche zur submikroskopischen Struktur und Histochemie der Kernnukleinsäuren.
Habilitationsschrift, Pécs, Hinweis bei Sandritter, Jobst, Rakow, Bosselmann, 1965 b
- JOHNS E.W., HOARE T.A., 1970
Histones and gene control.
Nature 226, S. 650-651
- JORDANOV J., 1963
On the transition of DNA to apurinic acid and the loss of the latter from tissues during Feulgen reaction hydrolysis.
Acta histochem. 15, S. 135-152
- KASTEN F.H., KIEFER G., SANDRITTER W., 1962
Bleaching of Feulgen stained nuclei and alteration of absorption curve after continuous exposure to visible light in a cytophotometer.
J.Histochem.Cytochem. 10, S. 547-555
- KIEFER G., KIEFER R., SANDRITTER W., 1968
Cytophotometric determination of the binding of basic dyes by DNA following acetylation.
Histochemie 14, S. 65-71
- KLINGER H.P., SCHWARZACHER H.G., 1960
The sex chromatin and heterochromatic bodies in human diploid and polyploid nuclei.
J.biophys.biochem.Cytol. 8, S. 345-364

- KLINGER H.P., SCHWARZACHER H.G., WEISS J., 1967
DNA content and size of sex chromatin positive female nuclei during the cell cycle.
Cytogenetics 6, S. 1 - 19
- KOSSEL A., 1911/12
Harvey Lect. (Philad.) 2, S. 33
Hinweis bei Bresch C., Hausmann D.
"Klassische und Molekulare Genetik".
Springer-Verlag, Berlin, 1970
- KOSSEL A., 1928
The Protamines and Histones.
Longmans, Green Co., New York
- LAMPERT F., 1968
Kerntrockengewicht, DNS-Gehalt und Chromosomen bei akuten Leukämien im Kindesalter.
Virchows Archiv B 1, S. 31-48
- LEDERER B., BÜTTERICH C., MOORE G.W., MITTERMAYER C., 1970
Autoradiographic studies on the incorporation rate of ^3H -Thymidine during the S-phase of the mitotic cycle.
Beitr.Path. 141, S. 75-80.
- LEDERER B., LENNARTZ K.J., 1968
Cytophotometrische und autoradiographische Untersuchungen des Wachstums von Ascitestumoren.
Z.Krebsforsch. 70, S. 230-236
- LEEMANN U., RUCH F., STRÄULI P., 1968
Characterization of the nuclei of Ehrlich Ascites Carcinome by means of quantitative cytochemistry.
Acta Cytologica 12, S. 381-394
- LEUCHTENBERGER C., 1958
"DNA determination by microspectrophotometry" in J.F.Danielli
"General Cytochemical Methods" Vol. 1
Academic Press, New York

LEUCHTENBERGER C., KLEIN G., KLEIN E., 1952

The estimation of nucleic acids in individual isolated nuclei of ascites tumors.

Cancer Res. 12, S. 480-483

LEUCHTENBERGER C., LEUCHTENBERGER R., 1966

"DNA in tumors and virus infections" in Handbuch der Histochemie III/3, S. 1-53

LEUCHTENBERGER C., LEUCHTENBERGER R., DAVIS A.M., 1954

A microspectrophotometric study of the DNA content in cells of normal and malignant human tissues.

Amer.J.Path. 30, S. 65-85

LEVAN A., HAUSCHKA T.S., 1953

Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse.

J.Nat.Cancer Inst. 14, S. 1-40

LEVIJ J.S., MEULENDIJK P.N., 1960

Ned.Tijdschr.Geneesk. 104, S. 916

Hinweis bei Barr M.L., Int.Rev.Cytol. 19,

S. 35-95, 1966

LEWIS W.H., LEWIS M.R., 1924

in: COWDRY "General Cytology", Chicago, S. 383

Hinweis bei Grundmann E., Stein P.

Beitr.path.Anat. 125, S. 54-76, 1961

LIMA DE FARIA A., 1959

Differential uptake of ³H-Thymidine into hetero- and euchromatin in Melanoplus and Secale.

J.biophys., biochem.Cytol. 6, S. 457-466

LIMA DE FARIA A., JAWORSKA H., 1968

Late DNA synthesis in heterochromatin.

Nature 217, S. 138-142

LIMA DE FARIA A., REITALU J., O'SULLIVAN M.A., 1965

Replication of autosomal heterochromatin in man.

Chromosoma 16, S. 152-161

LINNERT G., 1955

Die Struktur der Pachytänchromosomen.
Chromosoma 7, S. 90-128

LYON M.F., 1961

Gene action in the X-chromosome of the mouse
(*Mus musculus* L.)
Nature 190, S. 372-373

LYON M.F., 1962

Sexchromatin and gene action in the mammalian
X-chromosome.
Amer.J.hum.Genet. 14, S. 135-148

MAKINO S., KANO K., 1953

Cytological studies of tumors: characteristic chromosome individuality in tumor strains in ascites tumors of rats.
J.Nat.Cancer Inst. 13, S. 1213-1225

MANN K., MUKHERJEE B.B., 1970

Absence of differential RNA-synthesis by the
X-chromosomes of cow leucocytes.
Canad.J.Genet.Cytol. 12, S. 44-52

MARQUARDT H., GLÄSS E., 1957

Die Chromosomenzahlen in den Leberzellen von Ratten
verschiedenen Alters.
Chromosoma 8, S. 617-636

MATHEY R., 1964

Evolution chromosomique et speciation chez les mus
du sous-genre *Leggada* Gray 1837.
Experientia 20, S. 657-665

MAURER W., KOBURG E., 1961

Autoradiographie: zeitlicher Verlauf der DNS-Synthese bei den Epithelien des Darmes und bei anderen Zellarten der Maus.
Verh.dtsch.Ges.Path. 45, S. 108-112

MAYALL B.H., 1967

Variability in the stoichiometry of deoxyribonucleic acid stain.

J.Histochem.Cytochem. 15, S. 762-763

MAYALL B.H., MENDELSON M.L., 1970

DNA cytophotometry of stained human leukocytes.

J.Histochem.Cytochem. 18, S. 383-408

MAZIMAS J.A., HATCH P.T., 1970

Intranuclear distribution of satellite DNA from kangaroo rat.

Exp. Cell Res. 63, S. 462-466

MERKER H., 1971

Zum Stand der Diskussion über das Philadelphia-Chromosom.

Dtsch.med.Wschr. 96, S. 296-298

MILLER C.J., BREG W.R., MUKHERJEE B.B., 1963 a

Non random distribution of chromosomes in metaphase figures from cultured human leucocytes.

I. The peripheral location of the Y-chromosome.

Cytogenetics 2, S. 1-14

MILLER C.J., MUKHERJEE B.B., BREG W.R., 1963 b

Non random distribution of chromosomes in metaphase figures from cultured human leucocytes.

II. The peripheral location of chromosomes 13, 17-18 and 21.

Cytogenetics 2, S. 152-167

MITTERMAYER C., LEDERER B., KADEN P., SANDRITTER W., 1968

Untersuchungen an teilungssynchronen L-Zellen.

II. Die DNS-Synthese.

Histochemie 12, S. 75-82

Berichte Path. 76, S. 228-229, 1968

MITTWOCH U., 1969

Scope and limitations of Feulgen microdensitometry.

in: C.D. Darlington, K.R. Lewis

"Chromosomes Today" Vol. 2

Cliver + Boyd, Edinburgh, S. 90-98

MUKHERJEE B.B., SINHA A.K., 1963

Further studies on the pattern of chromosome duplication in cultured mammalian leucocytes.

Canad.J.Genet.Cytol. 5, S. 490-495

MUKHERJEE B.B., SINHA A.K., 1964

Single-active-X hypothesis: cytological evidence for random inactivation of X-chromosomes in a female mule complement.

Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 51, S. 252-259

MULLER H.J., PAINTER T.S., 1932

The differentiation of the sex chromosomes of *Drosophila* into genetically active and inert regions.

Zeitschr.ind.Abstam.Vererbungsl. 62, S. 316-365

NATARAJAN A.T., AHNSTRÖM G., 1969

Heterochromatin and chromosome aberrations.

Chromosoma 28, S. 48-61

NETTER H., 1959

"Theoretische Biochemie".

Springer-Verlag, Berlin

OHNO S., KAPLAN W.D., KINGSITA R., 1957

Heterochromatic regions and nucleolus organizers in chromosomes of the mouse.

Exp.Cell Res. 13, S. 358-364

OHNO S., KAPLAN W.D., KINGSITA R., 1959

Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus Norvegicus*.

Exp. Cell Res. 18, S. 415-418

OSBORNE T.B., HEYL F.W., 1908

The pyrimidine derivatives in nucleic acid.

Am.J.Physiol. 21, S. 157-161

OWEN M., 1963

Cell population kinetics of an osteogenic tissue II.

J.Cell Biol. 19, S. 33-44

- PATAU K.- SWIFT H., 1953
The DNA content of nuclei during mitosis in a root tip of onion.
Chromosoma 6, S. 149-169
- PAULSEN J., BEST E., FRESE K., RUDOLPH R., 1971
Enzootische lymphatische Leukose bei Schafen.
Lymphozytose, pathologische Anatomie und Histologie.
Zbl.Vet.Med. B 18, S. 33-43
- PELC S.R., 1968
Incorporation of ^3H -Thymidine in mouse spleen.
J. Cell Sci. 3, S. 263-272
- PELC S.R., VIOLA MAGNI M.P., 1969
Decrease of labeled DNA in cells of the adrenal medulla after intermittend exposure to cold.
J.Cell Biol. 42, S. 460-468
- PERA F., 1968
Dauer der DNS-Replikation von Eu-und Heterochromatin bei *Microtus agrestis*.
Chromosoma 25, S. 21-29
- PERA F., 1969
Struktur und Position der heterochromatischen Chromosomen in Interphasekernen von *Microtus agrestis*.
Z.Zellforsch.98, S. 421-436
- PERA F., WOLF U., 1967
DNS-Replikation und Morphologie der X-Chromosomen während der Syntheseperiode von *Microtus agrestis*.
Chromosoma 22, S.378-389
- PORTER I.R., BENEDICT W.F., BROWN C.D., PAUL B., 1969
Recent advances in molecular pathology: a review.
Some aspects of chromosome changes in cancer.
Exp.Mol.Path. 11 S. 340-367
- QUEISSER W., NOESKE K., SANDRITTER W., LENNERT K., 1966
Zytophotometrische Bestimmung des DNS-Gehaltes von Zellen des lymphatischen Gewebes.
Z.Zellforsch.75, S. 527-536

RICHARDS B.M., ATKIN N.B., 1960

The differences between normal and cancerous tissues with respect to the ratio of DNA content to chromosome number.

Acta Un.int.Cancr. 16, S. 124-128

RICHARDS B.M., PARDON J.F., 1970

The molecular structure of nucleohistone.

Exp.Cell Res. 62, S. 184-197

RIS H., 1945

The structure of meiotic chromosomes in the grasshopper and its bearing on the nature of chromomeres and lamp-brush chromosomes.

Biol.Bull.89, S. 242-257

ROELS H., 1966

Metabolic DNA: a cytochemical study.

Int.Rev.Cytol. 19, S. 1-34

ROSENBLOOM F.M., KELLEY W.N., HENDERSON J.F., 1967

Lyon hypothesis and X-linked disease.

Lancet 1967 II, S. 305-306

RUTISHAUSER A., 1963

Cytogenetik transplantabler tierischer und menschlicher Tumoren.

Neujahrsblatt der Naturforsch.Ges.in Zürich,S.1-85

SACHS L., 1968

"Statistische Auswertungsmethoden".

Springer-Verlag, Berlin

SANDBERG A., ISHIHARA T., MIWA T., HAUSCHKA T.S., 1961

The in vivo chromosome constitution of marrow from 34 human leukaemias and 60 nonleukaemic controls.

Cancer Res. 21, S. 678-689

SANDRITTER W., 1958

"Ultraviolett-mikrospektrophotometrie" in Handbuch der Histochemie I/1

(Allgemeine Methodik) S. 220-338

SANDRITTER W., 1961

Methoden und Ergebnisse der quantitativen Histochemie.

Dtsch.med.Wschr. 86, S. 2177-2183

SANDRITTER W., 1964 a

Cytophotometrische Untersuchungen am Fortiocarcinom und seinen Vorstufen.

Verh.dtsch.Ges.Path. 48, S. 34-43

SANDRITTER W., 1966

Methods and results in quantitative cytochemistry. aus G.L.Wied: "Introduction to quantitative cytochemistry".

SANDRITTER W., 1970

Funktionsstrukturen des Zellkerns.

Schattauer-Verlag, Stuttgart

SANDRITTER W., BÖHM N., 1964 b

Atypische Hydrolysekurve bei der Feulgenreaktion von Mäuseascitestumorzellen.

Die Naturwissenschaften 51, S. 273

SANDRITTER W., CARL M., RITTER W., 1966

Cytophotometric measurements of the DNA content of human malignant tumors by means of the Feulgen reaction.

Acta Cytologica 10, S. 26-30

SANDRITTER W., HILWIG I., ENGELBART K., KIEFER G., KIEFER R., 1965 a

Versuche zur Carcinogenese in vitro. Chromosomenanalysen und cytophotometrische Messungen des DNS-Gehalts.

Z.Krebsforsch. 67, S. 57-68

SANDRITTER W., JOBST K., RAKOW L., BOSSELMANN K., 1965 b

Zur Kinetik der Feulgenreaktion bei verlängerter Hydrolysezeit.

Histochemie 4, S. 420-437

SANDRITTER W., KIEFER G., RICK W., 1963

Über die Stöchiometrie von Gallocyaninchromalaun mit DNS.

Histochemie 3, S. 315-340

SANDRITTER W., KIEFER G., SCHLÜTER G., MOORE W., 1967

Eine cytophotometrische Methode zur Objektivierung der Morphologie von Zellkernen.

Histochemie 10, S. 341-352.

SANDRITTER W., MÜLLER D., GENSECKE C., 1960

UMSP-Messungen des Nukleinsäuregehaltes von Spermien und diploiden Zellen.

Acta histochem. 10, S. 139-154

Berichte Path. 48, S. 231, 1961

SANDRITTER W., PILLAT G., THEISS E., 1957

Zur Wirkung der Ribonuklease auf Leberzellen.

Exp.Cell Res.Suppl. 4, Hinweis bei Sandritter 1958

SCHIEMER H.G., 1967

Neue Wege der Cytometrie auf dem Gebiete der Krebsforschung, der allg.Biologie u.Pathologie.

Klin.Wschr. 45, S. 393-399

SCHMID W., 1967

Heterochromatin in mammals.

Archiv der Julius Klaus-Stiftung 42, S. 1-60

SCHMID W., LEPPERT M.F., 1969

Rates of DNA synthesis in heterochromatic and euchromatic segments of the chromosome complements of two rodents.

Cytogenetics 8, S. 125-135

SCHMID W., SMITH D.W., THEILER K., 1965

Chromatinstreifen in verschiedenen Zelltypen und Lokalisation von Heterochromatin auf den Metaphasechromosomen.

Archiv der Julius Klaus-Stiftung 40, S. 35-49

SCHNEDL W., 1969 a

Die DNS-Synthese im Sexchromatin.
Cytobiologie 1, S. 115-120

SCHNEDL W., 1969 b

Sexchromatin u. Kerngröße im Zellzyklus.
Chromosoma 27, S. 421-435

SCHWARZACHER H.G., 1970 a

"Das Heterochromatinproblem".
Vortrag am 6.10.70 im Institut für Humangenetik
der Universität Freiburg.

SCHWARZACHER H.G., 1970 b

Die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen an somatischen Chromosomen des Menschen.
Humangenetik 10, S. 195-208

SCHWARZACHER H.G., WOLF U., 1970

"Methoden in der medizinischen Cytogenetik".
Springer-Verlag, Berlin

SEIDEL A., SANDRITTER W., 1963

Cytophotometrische Messungen des DNS-Gehalts eines Lungenadenoms und einer malignen Lungenadenomatose.
Z.Krebsforsch. 65, S. 555-559

SHAW M.W., COHEN M.M., 1965

Chromosome exchanges in human leukocytes induced by Mitomycin C.
Genetics 51, S. 181-190

SIEGER M., PERA F., SCHWARZACHER H.G., 1970 a

Genetic inactivity of heterochromatin and heteropycnosis in *Microtus agrestis*.
Chromosoma 29, S. 349-364

SIEGER M., PERA F., SCHWARZACHER H.G., 1970 b

Differential RNA-Synthesis of Eu- and Heterochromatin in *Microtus agrestis*.
Experientia 26, S. 103

- SRINIVASACHAR D., PATAU K., 1959
Proportionality between nuclear DNA-content and
Feulgen dye-content.
Exp.Cell Res. 17, S. 286-298
- STACEY L., DERIAZ R.E., TEECE E.G., WIGGILL I.P., 1946
Chemistry of the Feulgen and Dische nucleal
reactions.
Nature 157, S. 740-741
- STEDMAN E., STEDMAN E., 1950
Cell specificity of Histones.
Nature 165, S. 780-781
- STICH H.F., FLORIAN S.F., EMSON H.E., 1960
The DNA content of tumor cells (Polyps and adeno-
carcinoma of large intestine in man).
J.Nat.Cancer Inst. 24, S. 471-482
- STROUN M., CHARLES P., ANKER P., PELC S.R., 1967
Metabolic DNA in heart and skeletal muscle and in
the intestine of mice.
Nature 216, S. 716-717
- STRUCK E., 1961
Vergleichende Untersuchungen über das "Geschlechts-
chromatin" bei einigen Haustieren mit Hilfe des
Buccaltests.
Z.Zellforsch. 55, S. 662-672
- SVENSSON G., 1960
Hinweis bei Sandritter W.
Zur Prüfung der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen
Gesetzes.
Acta histochem. 2, S. 194
- SWANSON C.P., 1963
"Cytology and Cytogenetics".
Macmillan, London
- TANAKA T., 1958
A study of the somatic chromosomes of rats.
Cytologia 18, S. 343-355

- TURNER J.Y., HAYES E.R., 1961
Histochemistry of plasmalogen.
Stain Technol. 36, S. 265-278
Berichte Path. 53, S. 219, 1962
- TSCHERMAK-WOESS E., 1963
Strukturtypen der Ruhekerne von Pflanzen und Tieren.
Protoplasma V, 1
- ULBRICH F., BEST E., PAULSEN J., NITSCHKE E., FRITZSCHE K., 1970
Beobachtungen an einer von der Leukose befallenen
Schafherde.
Tierärztl. Umschau 25, S. 277-283
- ULLERICH F.H., 1970
DNS-Gehalt und Chromosomenstruktur bei Amphibien.
Chromosoma 30, S. 1-37
- UMANO R., UPDIKE S., DOUNCE A.L., 1962
Ratio of total histone to DNA in dividing and
interphase cells.
Fed. Proc. 21, S. 156; Hinweis bei Black, Ansley,
Mandl: Arch. Path. 78, S. 350-368, 1964
- VIOLA-MAGNI M.P., 1965
Changes in the DNA content of adrenal medulla nuclei of rats intermittently exposed to cold.
J. Cell Biol. 25, S. 415-433
- WAKONIG R., STICH H.F., 1960
Chromosomes in primary and transplanted leukaemias of AKR mice.
J. Nat. Canc. Inst. 25, S. 295-305
- WALKER B.E., 1963
The question of nuclear stability during histogenesis, aging and carcinogenesis.
Cancer Res. 23, S. 157-164
- WHEELER E.E., 1969
An evaluation of cytochemical methods for the quantitative estimation of DNA.
J. Med. Lab. Technol. 26, S. 314-339

- WIED G.I., BARTELS P.H., BAHR G.F., OLDFIELD D.G., 1968
Taxonomic Intra-Cellular Analytic System (TICAS)
for cell identification.
Acta Cytologica 12, S. 180-204
- WIELAND E., SCHEUING G., 1921
Die fuchsin-schweiflige Säure und ihre Farbreaktion
mit Aldehyden.
Ber.dtsch.chem.Ges. 54, S. 2527-2538
- WILKINS M.H.F., 1963
Molecular configuration of nucleic acids.
Science 140, S. 941-950
- WILLIAMS C.A., OCKEY C.H., 1970
Distribution of DNA replicator sites in mammalian
nuclei after different methods of cell synchroni-
zation.
Exp.Cell Res. 63, S. 365-372
- WOOLAM D.H.M., MILLER J.W., FORD D.H.R., 1967
Points of attachment of pachytene chromosomes to
the nuclear membrane in mouse spermatocytes.
Nature 213, S. 298-299
- YASMINEH W.G., YUNIS J.J., 1970 a
Localization of mouse satellite DNA in constitutive
heterochromatin.
Exp.Cell Res. 59, S. 69-75
- YASMINEH W.G., YUNIS J.J., 1970 b
Satellite DNA in constitutive heterochromatin of
the guinea pig.
Science 168, S. 263-266
- YASMINEH W.G., YUNIS J.J., 1971
Satellite DNA in calf heterochromatin.
Exp. Cell Res. 64, S. 41-48

Es ist mir ein Bedürfnis, allen denen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt in erster Linie meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Eugen Weiß, für die Problemstellung und vor allem für die stets in großzügiger Weise gewährten Anregungen und Hilfen.

Ebenso bin ich Herrn Dr. Rudolf Hoffmann zu großem Dank verpflichtet, der mir mit regem Interesse und vielen wertvollen Ratschlägen jederzeit zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Walter Sandritter, Pathologisches Institut der Universität Freiburg, und insbesondere Herrn Dr. Gert Schlüter, Freiburg danke ich herzlich für die Gastfreundschaft und die mir gebotenen Möglichkeiten der Einarbeitung in die Zytometrie.

Ich bedanke mich weiterhin bei den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Endokrinologie der Tiere an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität, Gießen für ihre großzügig gewährte Gastfreundschaft. Insbesondere danke ich Herrn Prof. emer. Dr. Dr. h. c. Valentin Horn dafür, daß ich am UMSP 1 arbeiten durfte, sowie Herrn Heiter für die große Hilfe bei der statistischen Berechnung und Anfertigung der Diagramme.

In gleicher Weise danke ich Herrn Dr. Seibold und Frau Brüning am Institut für Biophysik der Justus Liebig-Universität für ihr großes Entgegenkommen.

Mein Dank gilt ferner Herrn Kurt Stumpf vom Veterinär-Pathologischen Institut für seine Mitarbeit von der Anfertigung der Zahlenraster am UMSP 1 bis zur zeichnerischen und rechnerischen Auswertung der Ergebnisse, sowie Fräulein Ute Schloßmacher für die technische Assistenz beim Anfertigen der Abbildungen. Auch allen anderen Mitarbeitern am Veterinär-Pathologischen Institut sei gedankt für ihr Entgegenkommen.

Mein innigster Dank gebührt meiner lieben Mutter für das reichlich mühevollen Schreiben dieser Arbeit.



LEBENS LAUF

Am 2. Mai 1944 wurde ich, Wolfgang Schmahl, als einziges Kind des Kaufmanns Georg Schmahl und seiner Ehefrau Maria, in Mainz geboren.

Nachdem mein Vater 1945 als im Krieg vermisst erklärt wurde, zog meine Mutter mit mir wieder zu ihren Eltern nach Memmingen.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Memmingen, ab 1954 die dortige Oberrealschule mit Gymnasium, an der ich 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1964 bis 1966 studierte ich an der Tierärztlichen Fakultät in München, von 1966 bis 1969 an der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen, wo ich am 2. Dezember 1969 das Staatsexamen bestand.

Seit Januar 1970 bin ich Doktorand am Veterinär-Pathologischen Institut, seit Mai 1970 dort als Verwalter einer wissenschaftl. Assistenstelle beschäftigt.

